



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Caracterização dos mecanismos de resistência à colistina em
isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos
carbapenemos**

Fátima Alexandra Tavares Rodrigues

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM
MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL**

Abril, 2019



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização dos mecanismos de resistência à colistina em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenemos

Autor: Fátima Alexandra Tavares Rodrigues

Orientador: Doutora Diana Machado

Coorientador: Professor Doutor Miguel Viveiros

Laboratório onde o trabalho experimental foi desenvolvido:

Unidade de Ensino e Investigação em Microbiologia Médica

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas



Trabalho parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal, através do projeto Ref^o PTDC/BIA-MIC-30692/2017, financiamento para o Centro de investigação Global Health and Tropical Medicine (GHTM) Ref^o UID/Multi/04413/2013 e bolsa de Pós-Doutoramento Ref^o SFRH/BPD/100688/2014 (DM).

Abril, 2019

**A presente Dissertação não foi redigida segundo o novo Acordo Ortográfico da
Língua Portuguesa, por opção do autor**

Os resultados apresentados foram objecto de apresentação em co-autoria das seguintes comunicações em reuniões científicas sob a forma de Poster:

Fátima Rodrigues, Diana Machado, Jéssica Antunes, Isabel Couto, Teresa Pacheco, Judite Batista, Cristina Toscano, Miguel Viveiros. 2019. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*: correlation between mutations in target genes and active efflux. NOVAsaúde IV Genetics Workshop. Lisboa, Portugal. 21 Março 2019.

José Ribeiro, Diana Machado, Jéssica Antunes, **Fátima Rodrigues**, Isabel Couto, Teresa Pacheco, Judite Batista, Cristina Toscano, Miguel Viveiros. 2019. Prevalence of genes encoding small multidrug resistant (SMR)-type efflux pumps in *Acinetobacter baumannii* resistant to carbapenems isolated in hospital environment. NOVAsaúde IV Genetics Workshop. Lisboa, Portugal. 21 Março 2019.

AGRADECIMENTOS

É neste pequeno espaço que tentarei transmitir a minha enorme gratidão a todas as pessoas que, com o seu importante contributo, contribuíram para o término de mais uma etapa da minha vida académica:

Ao meu Orientador, Professor Doutor Miguel Viveiros, Director do Grupo de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, agradeço pela sua orientação, pelas palavras de incentivo, sabedoria e pela simpatia demonstrada ao longo da elaboração deste trabalho.

À minha Orientadora, Doutora Diana Machado, um muito obrigado por todo o apoio, orientação, paciência e partilha de conhecimentos teóricos e práticos transmitidos, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Unidade de Ensino e Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, agradeço a disponibilização das condições laboratoriais necessárias para a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial ao Hospital de Lisboa que forneceu o material biológico indispensável para a realização do presente trabalho; agradeço aos Médicos, enfermeiros e técnicos de laboratório por todo o seu trabalho e informações facultadas.

Aos meus colegas de Mestrado, sobretudo à Elizandra Ferreira, Luís de Sousa e Rafael Oliveira, agradeço-lhes todo o apoio, simpatia, incentivo e força que me transmitiram ao longo destes meses.

A todos os meus amigos que fora deste ambiente académico sempre se preocuparam comigo, apoiaram-me incondicionalmente, deram-me força e entusiasmo para continuar. Estou-vos muito agradecida por todos os abraços apertados e pelas palavras de amizade nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais e irmão, pois sem eles nada disto seria possível, agradeço-lhes a compreensão, a motivação, a dedicação, o amor, as palavras sempre sábias nos momentos certos, pelo carinho, que me eram ao longo da vida, mas muito particularmente nesta fase.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

A colistina é um dos últimos recursos para tratar infecções causadas por estirpes de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes (MDR) com resistência adicional aos carbapenemos (XDR). A resistência à colistina deve-se principalmente à presença de mutações nos genes envolvidos na biossíntese do lípido A (LpxACD) ou devido a mutações nos genes que codificam o sistema de dois componentes PmrAB. Apesar de ser um assunto controverso, a resistência à colistina tem também sido associada à actividade de efluxo.

Neste trabalho, investigamos a interacção entre a actividade de efluxo e a presença de mutações associadas à resistência à colistina em *A. baumannii* MDR resistentes aos carbapenemos.

Analizamos uma colecção de 74 estirpes de *A. baumannii* das quais 72 eram XDR. A susceptibilidade aos antibióticos foi testada pelo método de difusão em disco (Kirby-Bauer). A determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) da colistina, brometo de etídio (EtBr, substrato de efluxo) e tioridazina (TZ, inibidor de efluxo) foram realizadas por microdiluição. A presença de mutações nos genes associados à resistência à colistina foi investigada por PCR e sequenciação de DNA. A existência de actividade de efluxo foi estudada pela determinação das CMIs usando o método “checkerboard” na presença de TZ. A tipagem molecular das estirpes resistentes à colistina foi feita por ERIC-PCR e MLST.

Das 72 estirpes de *A. baumannii* resistentes aos carbapenemos, oito apresentaram resistência à colistina variando entre 64 e 512 µg/ml. As CMIs do EtBr e TZ permaneceram constantes entre as estirpes resistentes à colistina. A pesquisa de mutações nos genes associados à resistência à colistina demonstrou a presença de mutações nos genes *lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, *pmrA* ou *pmrB*. Os ensaios de sinergia por “checkerboard” mostraram redução das CMIs da colistina na presença de TZ, variando entre 8x e 256x. A tipagem molecular por ERIC-PCR mostrou que as estirpes resistentes à colistina podem ser distribuídas em três clusters. Sete estirpes pertencem ao ST350 e uma pertence ao ST218. Das sete estirpes pertencentes ao ST350, duas foram isoladas em 2008 e cinco em 2010, indicando disseminação clonal de *A. baumannii* resistentes à colistina. Esta é a primeira descrição da presença do clone ST350 em Portugal.

Este estudo demonstra que a actividade de efluxo desempenha um papel na resistência à colistina, apesar também da presença de mutações nos genes associados à resistência à colistina. A actividade do efluxo pode afectar o desfecho clínico de infecções causadas por *A. baumannii* e o uso de inibidores do efluxo deve ser considerado para o desenvolvimento de novas terapias adjuvantes para combater a resistência à colistina.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; colistina; actividade do efluxo; inibidores de efluxo; mutações

ABSTRACT

Colistin is one of the last resources to treat infections caused by multidrug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* strains with additional resistance to carbapenems (XDR). Colistin resistance is mainly due to the presence of mutations in genes involved in lipid A biosynthesis (LpxACD) or due to mutations in genes that encode the two-component system PmrAB. Although a controversial topic, colistin resistance has also been associated with efflux activity. In this work, we investigated the interplay between efflux activity and the presence of mutations associated with colistin resistance in carbapenem resistant MDR *A. baumannii*.

We analysed a collection of 74 MDR *A. baumannii* strains, of which 72 were XDR. Drug susceptibility was accessed by disc diffusion (Kirby-Bauer). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of colistin, ethidium bromide (EtBr, efflux substrate) and thioridazine (TZ, efflux inhibitor) was performed by broth microdilution. The presence of mutations in the genes associated with colistin resistance were investigated by PCR and DNA sequencing. The existence of efflux activity was studied by MIC determination through checkerboard assays in the presence of TZ. Molecular typing of the colistin resistant strains was done by ERIC-PCR and MLST.

Among the 72 carbapenem-resistant *A. baumannii* strains, eight presented resistance to colistin ranging from 64 to 512 µg/ml. MICs of EtBr and TZ remain constant among the colistin resistant strains. The search of mutations in the genes associated with colistin resistance showed mutations in *lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, *pmrA* or *pmrB*. Synergistic checkerboard assays showed reductions of the MICs ranging from 8- to 256-fold for colistin in presence of TZ. Strain typing by ERIC-PCR showed that the colistin resistant strains could be distributed three clusters. Seven strains belong to the ST350 and the remaining one belong to the ST218. Among the seven ST350 strains, two were isolated in 2008 and five in 2010, indicating clonal dissemination of colistin resistant strains. This is the first description of the ST350 clone in Portugal.

This study demonstrated that efflux activity plays a role in colistin resistance despite the presence of mutations in the genes associated with colistin resistance. Efflux activity may affect the clinical outcome of infections caused by *A. baumannii* and the use of efflux inhibitors should be considered for the development of new adjuvant therapies to tackle colistin resistance.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; colistin; efflux activity; efflux inhibitors; mutations

ÍNDICE GERAL

COMUNICAÇÕES	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE GERAL	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE UNIDADES	xv
1. Introdução	1
1.1. O género <i>Acinetobacter</i>	6
1.1.1. Características gerais	6
1.1.2. Taxonomia	6
1.1.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> e a sua importância clínica	7
1.1.4. A resistência aos antibióticos em <i>A. baumannii</i>	8
1.1.4.1. Mecanismos de resistência aos antibióticos utilizados na terapêutica de infecções por <i>A. baumannii</i>	9
1.1.4.2. Resistência mediada por efluxo em <i>A. baumannii</i>	11
1.1.5. As polimixinas	12
1.1.5.1. Mecanismo de acção e resistência às polimixinas	14
1.1.6. Objectivos desta Dissertação	15
2. Material e Métodos	16
2.1. Material	16
2.1.1. Material biológico	16
2.1.2. Outro material biológico	16
2.1.3. Meios de cultura e soluções	18
2.2. Métodos	21
2.2.1. Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas	21
2.2.2. Caracterização fenotípica	21
2.2.2.1. Teste de susceptibilidade aos antibióticos (TSA) de Kirby-Bauer	21

2.2.2.2. Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) pelo método de diluição em microplaca de 96 poços	23
2.2.2.3. Determinação de CMIs na presença de inibidores de efluxo pelo método de “checkerboard”	23
2.2.3. Caracterização genotípica	24
2.2.3.1 Extração e quantificação de DNA	24
2.2.3.2. ERIC-PCR	25
2.2.3.3. Tipagem por MLST	26
2.2.3.4. Detecção de mutações em genes associados à resistência à colistina	27
3. Resultados e Discussão	29
3.1. Caracterização do padrão de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados <i>A. baumannii</i> em estudo	29
3.2. Determinação de concentrações mínimas inibitórias para compostos antimicrobianos na presença e ausência de tioridazina	34
3.3. Avaliação da relação genética entre os isolados resistentes à colistina	38
3.4. Pesquisa de mutações nos genes de resistência à colistina nos isolados clínicos de <i>A. baumannii</i> resistentes	41
4. Conclusões gerais e perspectivas futuras	43
5. Referências bibliográficas	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Lista de microrganismos prioritários para investigação e desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)	1
Figura 2.	Percentagem de isolados de <i>A. baumannii</i> MDR invasivos com resistência combinada às fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenemos durante o período compreendido entre 2012 e 2016	4
Figura 3.	Factores que controlam a susceptibilidade, factores promovem a resistência e opções terapêuticas em <i>A. baumannii</i> resistente aos antibióticos	5
Figura 4.	Representação esquemática dos principais sistemas de efluxo	12
Figura 5.	Estrutura química das polimixinas	13
Figura 6.	Esquema representativo de uma placa de 96 poços para a determinação das CMIs	22
Figura 7.	Esquema representativo de uma placa de 96 poços para a determinação do efeito sinérgico entre a tioridazina e a colistina e o brometo de etídio	24
Figura 8.	Perfil de ERIC-PCR obtido para cada um dos oito isolados clínicos e estirpe de referência de <i>A. baumannii</i>	39
Figura 9.	Similaridade genética entre os isolados de <i>A. baumannii</i> obtidos por ERIC-PCR	339

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Antibióticos e combinações potencialmente activos contra os microorganismos incluídos na lista de microorganismos prioritários da OMS	2
Tabela 2.	Fontes de infecção ou colonização e factores de risco de <i>Acinetobacter</i> MDR em ambiente hospitalar	7
Tabela 3.	Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados na tipagem molecular dos isolados de <i>A. baumannii</i>	17
Tabela 4.	Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados para amplificação por e sequenciação de genes associados à resistência à colistina	18
Tabela 5.	Composição dos meios de cultura	19
Tabela 6.	Composição e preparação das soluções utilizadas	19
Tabela 7.	Composição e preparação das soluções-tampão utilizadas	19
Tabela 8.	Composição e preparação das soluções de compostos antimicrobianos usados	20
Tabela 9.	Antibióticos, cargas e “breakpoints” usados no método de Kirby-Bauer	20
Tabela 10.	Perfil de susceptibilidade aos antibióticos das estirpes de <i>A. baumannii</i> em estudo, determinado pelo método de Kirby-Bauer	30
Tabela 11.	Valores de CMI obtidos da colistina para as estirpes em estudo	32
Tabela 12.	Perfil de susceptibilidade combinado aos antibióticos das 74 estirpes de <i>A. baumannii</i> em estudo, determinado pelo método de Kirby-Bauer	33
Tabela 13.	Valores de CMIs da colistina, brometo de etídio e tioridazina para as estirpes clínicas de <i>A. baumannii</i> resistentes a colistina	35
Tabela 14.	Valores de CMI da colistina e brometo de etídio na presença e na ausência de tioridazina para as estirpes em estudo e determinação do factor de modulação (MF) entre colistina e tioridazina e brometo de etídio e tioridazina	36
Tabela 15.	Caracterização fenotípica das estirpes de <i>A. baumannii</i> em relação à presença de mutações nos genes associados a resistência à colistina	43

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ABC	Do inglês “(ATP)-Binding Cassette”
ADP	Difosfato de adenosina, do inglês “adenosine diphosphate”
AG	Aminoglicosídeos
AK	Amicacina
AMP	Ampicilina
ATB	Antibiótico
ATP	Trifosfato de adenosina trifosfato, do inglês “adenosine 5’-triphosphate”
BE	Bomba de efluxo
CA ²⁺	Ião de cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CARB	Carbapenemos
CAMHB	Do inglês “Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth”
CAZ	Ceftazidime
CC	Complexo clonal
CEF	Cefalosporinas
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Do inglês: “Clinical and Laboratory Standards Institute”
CMI	Concentração mínima inibitória
CN	Gentamicina
CTX	Cefotaxime
CPZ	Clorpromazina
CHL	Cloranfenicol
COL	Colistina
CRAB	<i>A. baumannii</i> resistente aos carbapenemos
CRE	<i>Enterobacteriaceae</i> resistentes aos carbapenemos
CRO	Ceftriaxona
CRPA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente aos carbapenemos
DBO	Diazabicyclooctano

DGS	Direcção Geral da Saúde
DHFR	Dihidrofolato redutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”
DO	Doxicilina
DOR	Doripenem
dNTP	Desoxirribonucleótidos 5’-trifosfatados
EUCAST	“European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESBLs	β -lactamases de largo espectro
EtBr	Brometo de etídio, do inglês “ethidium bromide”
FEP	Cefepime
FM	Factor de modulação
FQ	Fluoroquinolonas
GC	Do inglês “global clone”
GES	Do inglês “Guiana Extended Spectrum”
H ⁺	Ião hidrogénio
HCL	Ácido clorídrico
IMP	Imipenem
KB	“Kirby Bauer”
LEV	Levofloxacina
MATE	Do inglês “Multidrug and toxic compound extrusion”
MDR	Multiresistente, do inglês “Multidrug resistant”
MEM	Meropenem
Mg ²⁺	Ião Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHA	Mueller-Hinton Agar
MHB	Mueller-Hinton Broth
MLST	Do inglês “Multilocus Sequence Typing Scheme”
Na ⁺	Ião sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NET	Netilmicina
OH	Radicais hidroxilo

OMS	Organização Mundial de Saúde
OMP	Do inglês “Outer Membrane Protein”
OPP	Do inglês “Other Priority Pathogens”
PCR	Do inglês “Polymerase Chain Reaction”
PDR	Totalmente resistentes, do inglês “Pan-Drug Resistant”
PEN	Penicilina
PER	Do inglês “ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Extended Resistance”
PRL	Piperacilina
RND	Do inglês “Resistance Nodulation Cell Division”
SHV	Do inglês “Sulphydryl reagent Variable”
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TDR	Totalmente resistente
TE	Tetraciclina
TEM	Temorina
TET	Tetraciclina
TOB	Tobramicina
TZ	Tioridazina
TZP	Piperacilina-tazobactam
UPGMA	Do inglês “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”
UV	Ultra-violeta
VEB	Do inglês “Vietnamese Extended Spectrum β -lactamase”
XDR	Extensivamente resistente, do inglês “Extensively Drug Resistant”
wt	Do inglês “wild-type”

LISTA DE UNIDADES

g	Gramma
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
mM	Milimolar
µg	Microgramma
µL	Microlitro
mA	Miliampere
V	Volt
°C	Graus Celsius
rpm	Rotação por minuto

1. Introdução

A emergência de bactérias multirresistentes (MDR, do inglês “multidrug resistant”) é um problema de saúde pública a nível mundial (Tenover, 2006). O aumento da incidência de colonização e infecção por bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenemos em unidades de saúde preocupa tanto profissionais de saúde como as entidades de prevenção e controlo das infecções associadas aos cuidados de saúde e de resistência a compostos antimicrobianos. Em particular, a emergência e disseminação global de estirpes de *Acinetobacter baumannii* produtoras de carbapenemases, principalmente em ambiente hospitalar, constituem uma enorme fonte de preocupação (Figura 1) (Organização Mundial de Saúde, 2017).



Figura 1. Lista de microrganismos prioritários para investigação e desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). *Enterobacteriaceae* inclui: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, e *Morganella spp.* Micobactérias, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*, não estão incluídas nesta lista por serem já consideradas uma prioridade global estabelecida pela OMS (Adaptado de Organização Mundial de Saúde, 2017).

As opções terapêuticas para o tratamento destas infecções são limitadas, e estão associadas a elevadas taxas de mortalidade e morbilidade. De modo a reduzir a elevada morbilidade e mortalidade associadas a estas infecções, torna-se essencial a administração de uma terapêutica adequada, com agentes que possuam actividade *in vitro* e *in vivo* (Organização Mundial de Saúde, 2017). Actualmente, existem poucos novos fármacos em fase III de ensaios clínicos, pelo que em pouco tempo poderemos vir a ficar sem opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por estirpes MDR (Tabela 1).

Tabela 1. Antibióticos e combinações potencialmente activos contra os microorganismos incluídos na lista de microrganismos prioritários da OMS (Adaptado de Organização Mundial de Saúde, 2017). Uma vez que existem compostos e classes de tradução difícil para português, de modo a evitar traduções erradas, esta tabela é apresentada em inglês.

Name (synonym)	Phase	Antibiotic class	Expected activity against priority pathogens			
			CRAB	CRPA	CRE	OPP
Delafloxacin	NDA	Fluoroquinolone	×	×	×	×
Vaborbactam + meropenem (Carbavance)	NDA	Boronate BLI + carbapenem	×	×	×	
Cefiderocol	3	Siderophore-cephalosporin	×	×	×	
Relebactam + imipenem/cilastatin	3	DBO-BLI + carbapenem/ degradation inhibitor	×	×	×	
Sulopenem	3	Carbapenem	×	×	×	
Plazomicin	3	Aminoglycoside	×	×	×	
Lascufloxacin	3	Fluoroquinolone	×	×	×	×
Eravacycline	3	Tetracycline	×	×	×	
Omadacycline	3	Tetracycline	×	×	×	×
Solithromycin	3	Macrolide	×	×	×	×
Iclaprim	3	DHFR-inhibitor	×	×	×	×
Lefamulin	3	Pleuromutilin	×	×	×	×
MRX-1/MRX-4	2/3	Oxazolidinone	×	×	×	×
Gepotidacina	2	NBTI (Triazaacenaphthylene)	×	×	×	×
Zoliflodacin	2	NBTI (Spiropyrimidenetrione)	×	×	×	×
Murepavidin (POL-7080)	2	Novel membrane targeting antibiotic	×		×	
Brilacidin	2	Novel membrane targeting antibiotic	×	×	×	×
Nafithromycin (WCK-4873)	2	Macrolide	×	×	×	×
Afabicin (Debio-1450)	2	FabI inhibitor	×	×	×	×
Finafloxacin	2	Fluoroquinolone	×	×	×	×
LYS-228	1	Monobactam	×	×	×	
GSK-33342830	1	Siderophore-cephalosporin	×	×	×	

Name (synonym)	Phase	Antibiotic class	Expected activity against priority pathogens			
			CRAB	CRPA	CRE	OPP
AIC-499 + unknown BLI	1	β -lactam + BLI	×	×	×	
Zidebactam + Cefepime	1	Novel BLI/PBP2 binder + cephalosporin	×	×	×	
Nacubactam + unknown antibiotic	1	DBO-BLI/ PBP2 binder + unknown antibiotic	×	×	×	
AAI101 + cefepime or piperacillin	1	β -lactam BLI + cephalosporin or penicillin	×	×	×	
VNRX-5133 + unknown antibiotic	1	Boronate-BLI + unknown class	×	×	×	
ETX2514 + sulbactam	1	DBO-BLI /PBP2 binder + β -lactam-BLI/PBP1,3 binder	×	×	×	
SPR-741 + unknown antibiotic	1	Polymixin + unknown antibiotic	×	×	×	
TP-271	1	Tetracycline	×	×	×	×
TP-6076	1	Tetracycline	×	×	×	
KBP-7072	1	Tetracycline	×	×	×	×
TNP-2092	1	Rifampicin-quinolone hybrid	×	×	×	×
Alalevonadifloxacin	1	Fluoroquinolone	×	×	×	×

Actividade patogénica: ×, activa; ×, possivelmente activa; ×, sem actividade ou actividade insuficientemente. Os únicos agentes antimicrobianos que foram testados em outros microrganismos prioritários (OPP) foram aqueles que não demonstraram actividade quando testados em microrganismos de prioridade crítica.

Abreviaturas: BLI, Inibidor de β -lactamases; CRE, *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos e às cefalosporinas de terceira geração; CRAB, *A. baumannii* resistente aos carbapenemos; CRPA, *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenemos; DBO, diazabicyclooctane; DHFR, dihydrofolate reductase; NBTI, novo inibidor da topoisomerase II bacteriana; NDA, pedido de novo medicamento OPP, outros microrganismos prioritários na lista de microrganismos prioritários da OMS ("alta" e "média" prioridade); PBP, proteína de ligação à penicilina.

A. baumannii emergiu como microorganismo de prioridade crítica para investigação e desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos devido à sua enorme propensão para adquirir resistência à grande maioria dos antibióticos actualmente disponíveis.

Segundo a Direcção Geral da Saúde (DGS), Portugal está entre os países europeus com a mais elevada taxa de *Acinetobacter* com resistência combinada a compostos antimicrobianos (Direcção Geral da Saúde, 2017). Na Figura 2 pode observar-se uma tendência decrescente de *A. baumannii* MDR em Portugal entre 2012 e 2016. Este decréscimo pode dever-se a um diagnóstico mais rápido, dada a importância destas infecções. Em 2012 registou-se uma taxa de resistência combinada às fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenemos de 64,3% que tem vindo a ser gradualmente reduzida, tendo-se atingido uma taxa de resistência de 37,9 % em 2016. No entanto, esta ainda se mantém acima da média da União Europeia (31,7%) (Direcção Geral da Saúde, 2017).

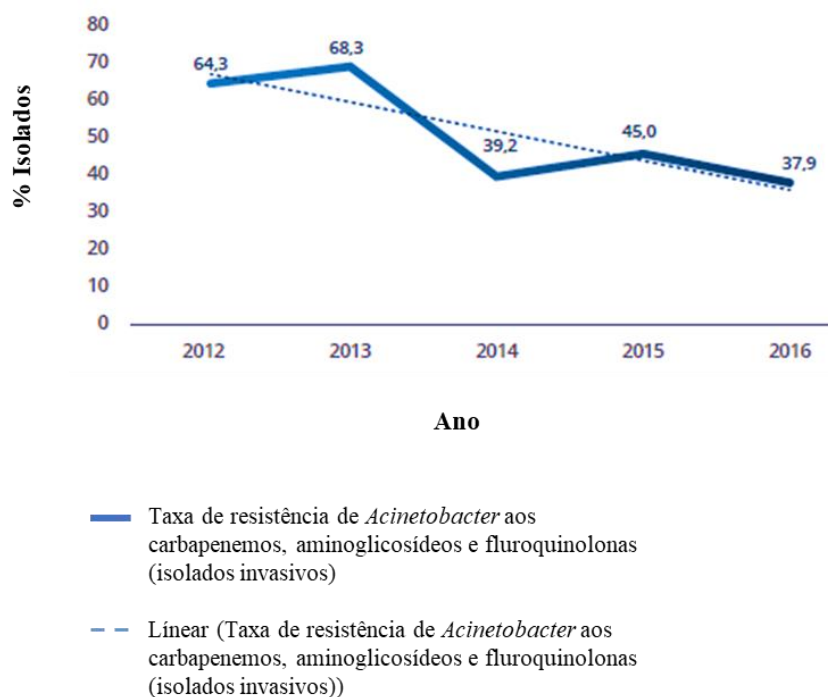


Figura 2. Percentagem de isolados de *A. baumannii* MDR invasivos com resistência combinada às fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenemos durante o período compreendido entre 2012 e 2016 (Adaptado de Direção Geral da Saúde, 2017).

A sua elevada capacidade de sobreviver à dessecação e resistência aos antibióticos tem permitido a disseminação destas estirpes em ambiente hospitalar tornando difícil o controlo e o tratamento destas infecções (Figura 3). Estirpes de *A. baumannii* MDR com resistência adicional aos carbapenemos são um problema a nível mundial. As tetraciclina tigeiciclina e minociclina e a colistina (uma polimixina) constituem actualmente a terapêutica de 2ª linha para o tratamento destas infecções (Fishbain e Peleg, 2010; Viehman *et al.*, 2014; Vila e Pachón, 2008). Deste modo, o estudo dos mecanismos associados ao desenvolvimento de resistência torna-se particularmente importante para esta espécie.

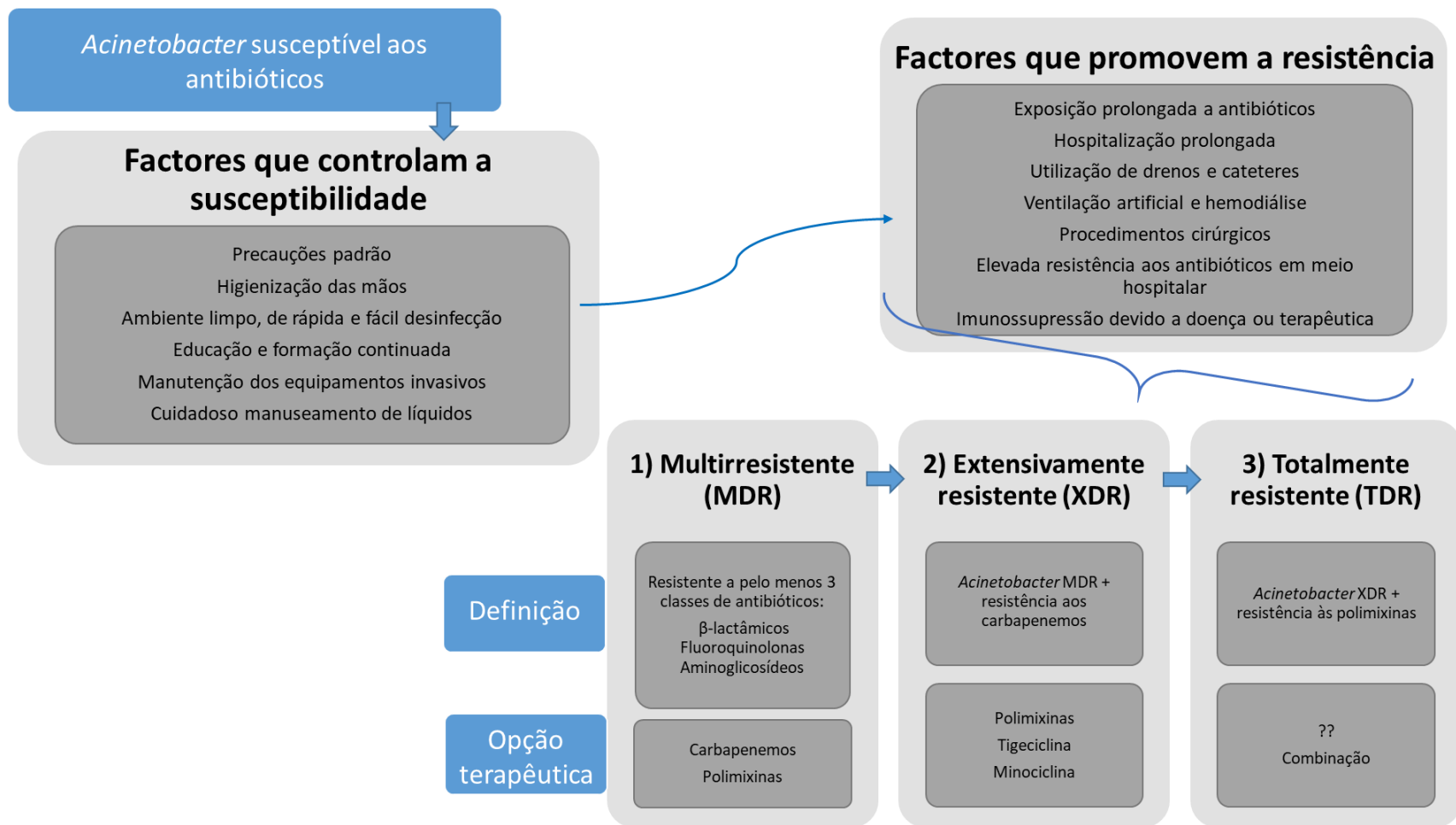


Figura 3. Factores que controlam a susceptibilidade, factores que promovem a resistência e opções terapêuticas em *A. baumannii* resistente aos antibióticos (adaptado de Manchanda *et al.*, 2010). β-lactâmicos incluem cefalosporinas e combinações entre β-lactâmicos e inibidores de β-lactamases. A terapêutica combinada inclui, principalmente, rifampicina, doxiciclina ou sulbactam (Fishbain e Peleg, 2010; Viehman *et al.*, 2014; Vila e Pachón, 2008).

1.1. O género *Acinetobacter*

1.1.1 Características gerais

“*A.ci.ne'to.bac.ter*” deriva da junção do grego “*akinetos*” (imóvel) e “*bacter*” (no masculino “*bactrum*” ou bacilo). Os membros do género *Acinetobacter* são bacilos Gram-negativos com 0.9-1.6 µm x 1.5-2.5 µm, tornando-se esféricos na fase estacionária de crescimento (Euzéby *et al.*, 1997; Parte *et al.*, 2013; Parte *et al.*, 2018). São imóveis, aeróbios estritos, não fermentadores de glucose, produtores de catalase, não produtores de oxidase e não formadores de esporos. A maioria das estirpes não é capaz de reduzir nitratos a nitritos. Crescem bem na maioria dos meios complexos sendo nutricionalmente pouco exigentes, com raras exceções (Euzéby *et al.*, 1997; Parte *et al.*, 2013; Parte *et al.*, 2018). A maioria das estirpes cresce entre 20 °C e 37°C; no entanto, algumas estirpes não conseguem crescer a 37°C. A temperatura óptima de crescimento situa-se entre os 33°C e os 35°C (Euzéby *et al.*, 1997; Parte *et al.*, 2013; Parte *et al.*, 2018). As colónias são geralmente não pigmentadas e são mucóides quando as células se encontram encapsuladas. Geralmente encontram-se aos pares formando cadeias de tamanho variável. Possuem um conteúdo G+C no seu DNA entre 38% e 47% (Euzéby *et al.*, 1997; Parte *et al.*, 2013; Parte *et al.*, 2018).

1.1.2 Taxonomia

A taxonomia do género *Acinetobacter* é complexa e está envolvida numa longa história de debate e mudança, continuando ainda em permanente evolução. O género *Acinetobacter* pertence à família *Moraxellaceae*, sendo actualmente constituído por 62 espécies (Euzéby *et al.*, 1997; Parte *et al.*, 2013; Parte *et al.*, 2018, <http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>, acessado a 25 Abril 2019). A maioria das espécies não tem relevância clínica, sendo frequentemente encontradas em ambientes húmidos, como o solo ou a água. As espécies ambientais podem funcionar como reservatórios de genes de resistência, como β-lactamases de largo espectro (ESBLs) ou carbapenemases, que podem ser transmitidos para estirpes com relevância clínica (Wong *et al.*, 2017).

1.1.3. *Acinetobacter baumannii* e a sua importância clínica

Acinetobacter baumannii é a espécie de maior importância clínica dentro do género *Acinetobacter*. É um agente patogénico nosocomial grave e emergente (Paul *et al.*, 2009). Ainda não se conhece o reservatório natural de *A. baumannii*, uma vez que a percentagem de isolados em fezes e pele de indivíduos saudáveis é baixa, o que leva a crer que esta bactéria não é um colonizador natural do corpo humano (Silva, 2014). A propensão para a aquisição de infecções causadas por *A. baumannii* depende de factores inerentes ao hospedeiro, ao meio hospitalar e ao próprio microorganismo (Tabela 2) (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Manchanda *et al.*, 2010; McConnell *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2007).

Tabela 2. Fontes de infecção ou colonização e factores de risco de *Acinetobacter* MDR em ambiente hospitalar (adaptado de Dijkshoorn *et al.*, 2007; Manchanda *et al.*, 2010; McConnell *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2007).

Fontes de infecção ou colonização por *Acinetobacter* MDR em ambiente hospitalar

Mãos dos funcionários do hospital
Equipamentos usados para terapias respiratórias
Alimentação (incluindo alimentação hospitalar)
Torneiras
Bomba de perfusão
Colchões, almofadas, lençóis e cobertores existentes nas proximidades de indivíduos infectados
Dispensador de detergentes
Grades de camas, carros de transporte de material hospitalar, chuveiros, tampos de mesas
Canalização hospitalar
Pavimento das enfermarias e anexos

Factores de risco para infecção ou colonização por *Acinetobacter* MDR

Internamento prolongado em ambiente hospitalar
Exposição continuada em unidades de cuidados intensivos
Utilização de equipamentos de ventilação
Exposição a agentes antimicrobianos p.e., carbapenemos, colistina
Cirurgias recentes
Procedimentos invasivos
Gravidade da doença

A. baumannii infecta sobretudo indivíduos hospitalizados, podendo causar pneumonias, muitas vezes associadas à ventilação artificial e septicemia em indivíduos

com doenças subjacentes graves; pode causar infecções de pele e tecidos moles, infecções de feridas cirúrgicas, infecções urinárias e meningite secundária (Silva, 2014). Alguns dos factores que nos tornam mais vulneráveis à infecção por *A. baumannii* incluem a imunossupressão, ter sido sujeito a cirurgias, queimaduras, a prematuridade, idade e/ou ter sido submetido a qualquer outro procedimento invasivo (Perez *et al.*, 2007). Têm sido descritos casos de infecção por *A. baumannii* em contexto de desastres naturais, como o terramoto de Marmana na Turquia e em áreas de conflito, por exemplo no Iraque e no Afeganistão, principalmente envolvendo infecções de pele (Antunes *et al.*, 2014). Em contexto hospitalar a taxa de mortalidade associada à infecção por *A. baumannii* é de aproximadamente 30% (Perez *et al.*, 2007).

1.1.4. A resistência aos antibióticos em *A. baumannii*

A resistência aos fármacos em *A. baumannii* tem vindo a evoluir progressivamente desde 1970, altura em que a maioria das estirpes eram susceptíveis aos antibióticos comumente utilizados na terapêutica destas infecções. Em 2007, 70% dos isolados eram já MDR, tendo sido já isoladas estirpes de *A. baumannii* resistentes a todos os antibióticos disponíveis (Antunes *et al.*, 2014). Os principais mecanismos associados à resistência aos antibióticos em *A. baumannii* incluem a expressão de β -lactamases, produção de enzimas modificadoras do antibiótico, e alterações na permeabilidade de membrana (Mussi *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2007, Zarrilli *et al.*, 2009). Recentemente, a expressão de sistemas de efluxo tem vindo a ser considerada como um mecanismo de resistência em *Acinetobacter baumannii* (Machado *et al.*, 2018). Adicionalmente, a sua capacidade para formar biofilmes é outro dos factores que contribuem para o desenvolvimento de resistência a diversos compostos antimicrobianos (Singhai *et al.*, 2012). A formação de biofilmes é de extrema importância em infecções hospitalares, pois a utilização de cateteres e ventiladores proporcionam condições ideais para a aderência e crescimento de bactérias, levando assim à conseqüente formação de biofilmes, promovendo a infecção no doente e resistência aos antibióticos (Coelho *et al.*, 2006).

1.1.4.1. Mecanismos de resistência aos antibióticos utilizados na terapêutica de infecções por *A. baumannii*

O tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR baseia-se numa terapêutica com carbapenemos, nomeadamente imipenem, meropenem ou doripenem, como tratamento de primeira linha. A terapêutica de segunda linha para *A. baumannii* MDR com resistência adicional aos carbapenemos (XDR) inclui a colistina (polimixina E), a tigeciclina ou a minociclina (Figura 3, pág. 5). Em alguns casos, poderá ser utilizada a terapêutica combinada com rifampicina, doxiciclina ou o sulbactam, um inibidor de β -lactamases (Fishbain e Peleg, 2010; Viehman *et al.*, 2014; Vila e Pachón, 2008), principalmente em combinação com colistina, tentando assim impedir o aumento do número de estirpes resistentes a este antibiótico (Petrosillo *et al.*, 2008) e para o tratamento de estirpes totalmente resistentes (Manchanda *et al.*, 2010). Estudos indicam que as combinações colistina/meropenem, colistina/rifampicina e colistina/minociclina apresentam efeitos sinérgicos *in vitro* contra *A. baumannii* (Cai *et al.*, 2012). A combinação minociclina/meropenem também pode ser uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por estirpes de *A. baumannii* XDR quando a colistina não está disponível (Liang *et al.*, 2011).

Os β -lactâmicos inibem a síntese da parede celular ligando-se às PBPs (do inglês “Penicillin binding proteins”), impedindo a síntese do peptidoglicano (Shahid *et al.*, 2009). *A. baumannii* possui uma β -lactamase de classe C ou cefalosporinase, a AmpC, designada por ADC (do inglês “Acinetobacter-derived cephalosporinase”) e que é codificada pelo gene *bla_{ADC}* (Poirel e Nordmann, 2006). Esta β -lactamase é habitualmente expressa a níveis que não interferem com a susceptibilidade à maior parte dos β -lactâmicos, sendo somente capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de espectro reduzido (Evans *et al.*, 2013). No entanto, a presença da sequência inserção *ISAbal* a montante do gene *bla_{ADC}* promove a sobreexpressão desta β -lactamase resultando na resistência aos β -lactâmicos (Poirel e Nordmann, 2006). As sequências de inserção são elementos genéticos móveis com tamanho inferior a 2500 pb e estão amplamente distribuídas no genoma de *A. baumannii* (Corvec *et al.*, 2007). Consoante a sua localização, podem causar resistência a compostos antimicrobianos e a aumentar a virulência da estirpe em causa: podem estar em transposões, associadas a um gene de resistência (p.e. genes flanqueados por sequências de inserção), ou localizadas a montante de um gene e originar uma região promotora levando à sua sobreexpressão (Mahillon e

Chandler, 1998; Mugnier *et al.*, 2009). As β -lactamases de classe A também estão associadas à resistência a esta classe de antibióticos, p.e., a TEM (de “Temorina”), a SHV (de “Sulphydryl reagent Variable”), a GES (de “Guiana Extended Spectrum”), a VEB (de “Vietnamese Extended Spectrum β -lactamase”) ou a PER (de “*Pseudomonas aeruginosa* Extended Resistance”) (Poirel *et al.*, 2012).

Os carbapenemos são antibióticos β -lactâmicos que possuem uma estrutura molecular distinta dos outros β -lactâmicos, o que lhes confere resistência à maioria das β -lactamases. Os carbapenemos entram na célula através de porinas ou proteínas de membrana externa (OMP, do inglês “Outer Membrane Protein”) e possuem capacidade de se ligar a várias PBPs inibindo a síntese da parede bacteriana (Zhanel *et al.*, 2007). O principal mecanismo de resistência aos carbapenemos é a produção de enzimas capazes de hidrolisar carbapenemos (CHDLs) ou carbapenemases, tais como as oxacilinasas, ou β -lactamases de classe D. Estas enzimas são capazes de hidrolisar também a oxacilina, cloxacilina e a meticilina (Zavascki *et al.*, 2010) e, com menor eficácia, as cefalosporinas. A OXA-51 é a única CHDL intrínseca descrita em *A. baumannii* (Héritier *et al.*, 2005). É expressa a um nível basal, não estando associada à resistência aos carbapenemos, excepto quando possui a sequência de inserção IS*AbaI* a montante do gene *bla*_{OXA-51} que origina uma região promotora induzindo a sobreexpressão deste gene e consequentemente resistência aos carbapenemos (Poirel *et al.*, 2010). As metalo- β -lactamases (MBLs), ou β -lactamases de classe B, possuem maior capacidade para hidrolisar carbapenemos quando comparadas com as oxacilinasas, no entanto, estas enzimas são raras em isolados clínicos de *A. baumannii* (Bonnin *et al.*, 2013). Apesar da resistência aos carbapenemos ser principalmente mediada pela expressão de MBLs e CHDLs, algumas ESBLs (do inglês “Extended-Spectrum β -Lactamases”) de classe A também apresentam actividade de carbapenemase, como é o caso da KPC (de “*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase”) e da GES. A resistência aos carbapenemos pode ainda dever-se à reduzida permeabilidade da membrana ou à expressão de sistemas de efluxo (Poirel e Nordmann, 2006).

Os aminoglicosídeos actuam por inibição da síntese proteica ligando-se à subunidade ribossomal 30S (McCoy *et al.*, 2011). Os principais mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos em *A. baumannii* incluem a produção de enzimas modificadoras do antibiótico, como a 16S rRNA metiltransferase ArmA (Seward *et al.*, 1998) e o efluxo de aminoglicosídeos. A bomba de efluxo AdeABC, pertencente à superfamília “Resistance Nodulation Division” (RND) e a AbeM, da família “Multidrug

and Toxic Compound Extrusion” (MATE), têm sido associadas ao efluxo de aminoglicosídeos contribuindo, deste modo para a diminuição da concentração do antibiótico no interior da célula bacteriana (Coyne *et al.*, 2011).

As tetraciclinas possuem um largo espectro de acção, actuando por inibição da síntese proteica ao ligarem-se à subunidade ribossomal 30S impedindo a ligação do aminoacil-tRNA (Chopra e Roberts, 2001). A tigeciclina é uma gliciliciclina (a 1^a disponível), derivada das tetraciclinas, e apresenta um largo espectro de acção idêntico às tetraciclinas (Doan *et al.*, 2006). É uma das alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por estirpes XDR (Cai *et al.*, 2017). Os mecanismos de resistência associados às tetraciclinas incluem a sobreexpressão dos sistemas de efluxo Tet(A) e Tet(B), pertencentes à família “Major Facilitator Superfamily” (MFS) e a produção de proteínas de protecção do alvo do antibiótico ou enzimas de protecção ribossomal, tais como a Tet(M) (Perez *et al.*, 2007; Vila *et al.*, 2007). Relativamente à tigeciclina, o principal mecanismo de resistência associado consiste na sobreexpressão de sistemas de efluxo, nomeadamente as bombas de efluxo AdeABC e AdeIJK, ambas RND (Ruzin *et al.*, 2007; Damier-Piolle *et al.*, 2008). Foi também descrito o possível envolvimento do gene *trm*, que codifica a metiltransferase S-adenosilmetionina, na susceptibilidade reduzida à tigeciclina (Chen *et al.*, 2014).

As polimixinas, por serem o foco deste trabalho são apresentadas em pormenor no ponto 1.1.5.

1.1.4.2. Resistência mediada por efluxo em *A. baumannii*

A resistência aos antibióticos mediada por efluxo é hoje reconhecida como um importante mecanismo de resistência em bactérias. As bombas de efluxo são proteínas de membrana que têm a função de desintoxicar as células expulsando moléculas nocivas. A extrusão (transporte do meio intracelular para o meio extracelular) de compostos antimicrobianos, como antibióticos, detergentes, corantes e biocidas, é considerada uma “função accidental” dos sistemas de efluxo (Costa *et al.*, 2013). Os sistemas de efluxo podem apresentar diferentes especificidades de substrato. Alguns são específicos para um antibiótico ou uma classe de antibióticos, outros podem transportar múltiplos compostos, i.e., mais de uma classe de compostos antimicrobianos. Estes sistemas possuem uma grande relevância clínica, pois podem conferir à célula bacteriana um fenótipo MDR, podendo também promover resistência cruzada entre antibióticos e outros compostos antimicrobianos (Costa *et al.*, 2013).

As bombas de efluxo constituem um dos mecanismos de resistência antimicrobiana em *A. baumannii*. Na sua maioria são codificados no cromossoma, sendo que poucos são codificados em elementos genéticos móveis (Li *et al.*, 2015). Os sistemas de efluxo podem dividir-se em dois grupos: transportadores primários e transportadores secundários (Li *et al.*, 2015; Wilkens *et al.*, 2015). Nos transportadores primários, inclui-se a superfamília “ATP-binding cassette” (ABC), cuja fonte de energia provém da hidrólise de ATP (do inglês “Adenosine Triphosphate”), enquanto que nos transportadores secundários incluem-se a família “Small Multidrug Resistance” (SMR); a família “Multidrug and Toxic Compound Extrusion” (MATE); “Major Facilitator Superfamily” (MFS) e a superfamília “Resistance Nodulation Cell Division” (RND). Os transportadores secundários utilizam o gradiente electroquímico causado pelo movimento de protões através da membrana, ou PMF (do inglês “Proton Motive Force”) (Paulsen *et al.*, 1996).

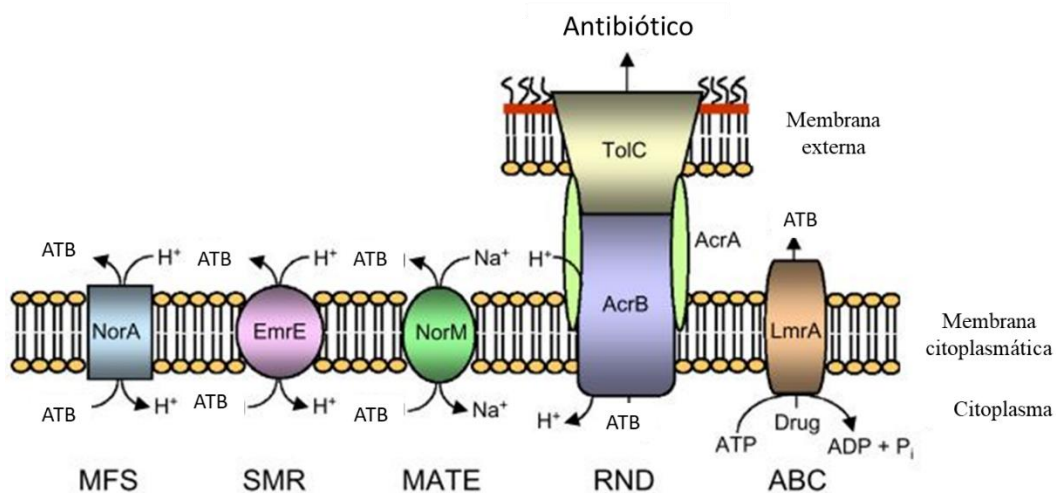


Figura 4. Representação esquemática dos principais sistemas de efluxo. Na imagem estão representadas a bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus* (MFS); a EmrE de *Escherichia coli* (SMR); NorM de *Vibrio parahaemolyticus* (MATE); AcrAB-TolC de *E. coli* (RND); e LmrA *Lactococcus lactis* (ABC) (Adaptado de Kumar e Schweizer, 2005).

1.1.5. As polimixinas

As polimixinas, polimixina B e polimixina E (colistina), foram descobertas na década de 40 e apresentam actividade bactericida contra bactérias Gram-negativas (Yahav *et al.*, 2012). São antibióticos hidrofóbicos, com carga positiva e possuem elevada afinidade para o LPS (do inglês “Lipopolysaccharide”). Esta classe inclui cinco substâncias estruturalmente relacionadas, que receberam o nome de polimixinas A, B, C,

D e E. A colistina é produzida por *Bacillus colistinus* e a polimixina B é sintetizada por *Bacillus polymyxa*. Devido à sua elevada toxicidade, apenas as polimixinas B e E são utilizadas em contexto clínico (Carvalho *et al.*, 2014). A colistina é utilizada na clínica sob forma de colestimetato de sódio com o intuito de reduzir a sua nefrotoxicidade.

As polimixinas são heptapeptídeos cíclicos com uma cadeia lateral de tripeptídeos ligadas a um terminal de ácidos gordos. As polimixinas B e E diferem apenas num aminoácido na posição 6: D-Phe (“D-phenylalanine”) na polimixina B e D-Leu (“D-leucine”) na colistina (Figura 5).

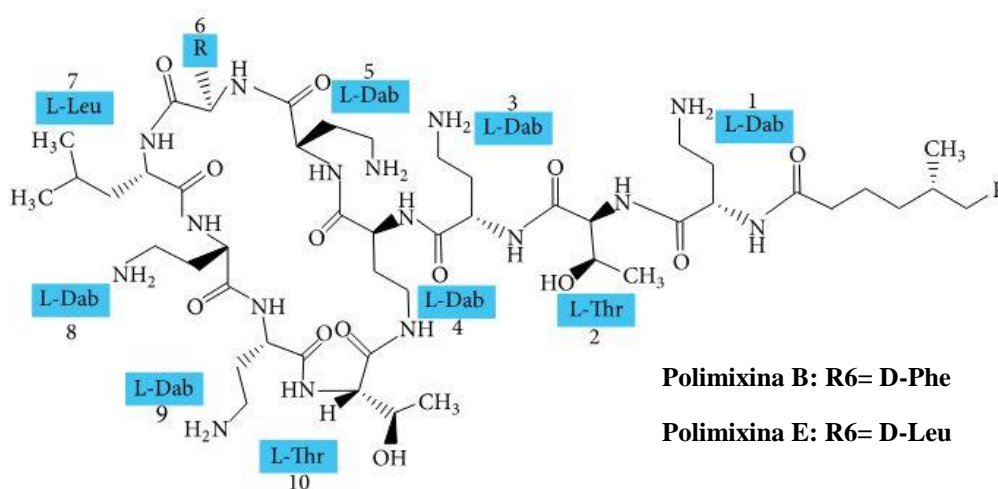


Figura 5. Estrutura química das polimixinas (Adaptado de Yu *et al.*, 2015).

A sequência decapeptídica das polimixinas inclui três secções: uma ansa heptapeptídica, uma cadeia lateral tripeptídica e uma cadeia de ácidos gordos. As polimixinas possuem resíduos catiónicos (L- α - γ -Dab), tornando-a policatiónica a pH 7,4, e dois domínios hidrofóbicos (cadeia acil N-terminal e segmento D-Phe6-L-Leu7 na polimixina B ou D-Leu6-L-Leu7 na polimixina E). A mistura dos grupos lipofílicos e hidrofílicos faz com que esta seja anfipática, característica que é essencial para a sua actividade antibacteriana (Yu *et al.*, 2015).

O principal mecanismo de resistência à colistina em *A. baumannii* está relacionado com a perda do LPS devido à presença de mutações ou à presença de sequências de inserção (p.e. *ISAbal1*) nos genes *lpxA*, *lpxC* ou *lpxD*, essenciais para a biossíntese do lípido A do LPS, inactivando-os (Moffatt *et al.*, 2010; Moffatt *et al.*, 2011), ou a existência de mutações nos genes que regulam a expressão do lípido A e que codificam o sistema de dois componentes PmrAB, designados por *pmrA* e *pmrB*, levando à modificação do lípido A por adição de fosfoetanolamina (Adams *et al.*, 2009; Beceiro *et*

al., 2011). O uso das polimixinas na terapêutica de infecções por bactérias Gram-negativas foi abandonado na década de 70 devido aos efeitos secundários graves causados por estes antibióticos, tais como a nefrotoxicidade e a neurotoxicidade (Nation e Li, 2009). No entanto, a emergência de estirpes de *A. baumannii* MDR resistentes aos carbapenemos levou à reintrodução desta classe de antibióticos na terapêutica destas infecções (Perez *et al.*, 2007). A incidência de estirpes resistentes à colistina ainda é baixa, mas está a aumentar dada a utilização intensiva deste antibiótico (Kim *et al.*, 2014; López-Rojas *et al.*, 2011; Rolain *et al.*, 2011; Valencia *et al.*, 2009).

1.1.5.1. Mecanismo de acção e resistência às polimixinas

Como referido anteriormente, as polimixinas têm como alvo de acção a membrana externa das bactérias Gram-negativas. Sabe-se que o alvo inicial é o LPS, no entanto, o mecanismo de acção das polimixinas ainda não está totalmente elucidado (Poirel *et al.*, 2017). O LPS é constituído por três regiões, o lípido A, uma região central oligossacáridica e uma cadeia externa, o antígeno O (Weber *et al.*, 2016). As polimixinas ligam-se ao LPS, deslocando os catiões divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} através de interacções electrostáticas entre os resíduos Dab (α - γ -diaminobutyric acid) carregados positivamente e os grupos fosfato do lípido A carregados negativamente (Dixon e Chopra, 1986). Uma vez que o Ca^{2+} e Mg^{2+} actuam como estabilizadores da membrana, a interacção electrostática estabelecida entre a polimixina e o lípido A vai destabilizar o LPS, aumentando a permeabilidade celular, levando à perda do conteúdo celular e morte da bactéria (Li *et al.*, 2006; Falagas *et al.*, 2005).

A resistência de alto nível à colistina (concentração mínima inibitória (CMI) > 128 $\mu\text{g/ml}$) resulta da perda total do lípido A, originando uma membrana externa deficiente em LPS com carga negativa reduzida. Este mecanismo de resistência deve-se à ocorrência de mutações, deleções, inserções, ou inactivação de genes via inserção de elementos genéticos móveis como transposões ou sequências de inserção nos genes responsáveis pela biossíntese do lípido A, *lpxA*, *lpxC* ou *lpxD* (Moffatt *et al.*, 2010).

Níveis moderados resistência à colistina (CMI > 32 $\mu\text{g/ml}$) podem resultar da adição de fosfoetanolamina (pEtN) à cadeia de fosfatos que compõem o lípido A, reduzindo a carga negativa do LPS e, portanto, a interacção com a colistina. A resistência à colistina mediada por pEtN geralmente resulta de mutações no operão *pmrCAB* que levam à activação constitutiva do sistema de transdução de sinal de dois componentes

PmrAB, que por sua vez leva ao aumento da expressão da transferase pEtN específica do lipídio A, PmrC (Adams *et al.*, 2009; Arroyo *et al.*, 2011; Beceiro *et al.*, 2011).

A resistência à colistina pode também ocorrer através da adição de galactosamina aos fosfatos do lipídio A, conduzindo a uma carga superficial negativa e reduzida, diminuindo assim a interacção com a colistina carregada positivamente. Embora a desacetilase NaxD regulada pelo gene *pmrB* tenha sido identificada como essencial para a adição de galactosamina ao lipídio A, nenhuma galactosamina transferase foi ainda identificada em *A. baumannii* (Lucas *et al.*, 2018). A recente descoberta de que a inactivação do regulador global transcricional H-NS está associada a resistência de alto nível à colistina revela a existência de um novo mecanismo de resistência (Lucas *et al.*, 2018). Adicionalmente, sabe-se que os sistemas de efluxo estão envolvidos na resistência à colistina (Machado *et al.*, 2018).

1.1.6. Objectivos desta Dissertação

O desenvolvimento e a emergência de resistência aos antibióticos em *A. baumannii* é actualmente um problema de Saúde Pública global. Infecções por *A. baumannii* encontram-se associadas a uma considerável morbidade e mortalidade principalmente em ambiente hospitalar (de Sousa, 2000). *A. baumannii* está incluído no grupo de microrganismos de importância major em Saúde Pública que devem ser epidemiologicamente vigiados, o grupo “ESKAPE” que, para além deste, inclui também *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp., bem como *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium* spp e *M. tuberculosis* (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015). Desde modo, torna-se imperativo compreender os mecanismos de resistência das estirpes circulantes de modo a definir estratégias para o seu tratamento e impedir o seu desenvolvimento e disseminação.

Apesar da resistência a colistina estar também associada ao efluxo (Machado *et al.*, 2018), ainda pouco é conhecido sobre como é que esta actividade se pode correlacionar com a presença dos determinantes genéticos normalmente associados à resistência à colistina em *A. baumannii*. O objectivo principal deste estudo consistiu em avaliar a interacção entre a actividade de efluxo e a presença de mutações associadas à resistência à colistina em estirpes de *A. baumannii* MDR resistentes aos carbapenemos.

2. Material e Métodos

2.1. Material

2.1.1. Material biológico

Neste estudo foram analisados 68 isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes de um surto em doentes com infecções respiratórias, isolados entre Dezembro de 2008 e Janeiro de 2009, num hospital da região de Lisboa. Os isolados foram seleccionados para este trabalho de acordo com o perfil de susceptibilidade aos carbapenemos. A sua identificação foi realizada com o sistema Vitek GNI+ cards (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França) tendo sido posteriormente enviados para a Unidade de Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), em placas de agar suplementadas com 5% gelose sangue (bioMérieux) tendo sido posteriormente conservados a -80°C em Mueller-Hinton broth suplementado com 10% de glicerol. Os isolados são designados ao longo deste trabalho pela designação de espécie (Ab), ano de isolamento seguido da identificação numérica sequencial definida para cada um dos isolados (p.e, Ab08-10 corresponde a *A. baumannii* isolado em 2008, isolado 10). A estirpe tipo *A. baumannii* ATCC19606^T (DSMZ, Alemanha), foi usada como referência ao longo deste trabalho. Foram incluídos seis isolados resistentes aos carbapenemos e à colistina, isolados em Janeiro de 2010, para análise fenotípica, genotípica e correlação epidemiológica relativamente aos isolados obtidos anteriormente.

2.1.2. Outro material biológico

O marcador NZYDNA Ladder VII (NZYTech, Lisboa, Portugal) foi usado para a determinação do peso molecular dos produtos PCR. Os “primers” utilizados na caracterização genética das estirpes por PCR estão descritos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados na tipagem molecular dos isolados de *A. baumannii*.

Gene	“Primers”	Sequência (5' → 3')	Fragmento (pb)	Referência
ERIC-PCR				
	ERIC1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Variável	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
	ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		
MLST				
<i>gltA</i>	Citrato F1	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	722	Jolley <i>et al.</i> , 2018
	Citrato R12	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG		
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> _F	TGAAGGCGGCTTATCTGAGT	594	
	<i>gyrB</i> _R	GCTGGGTCTTTTTCTGACA		
<i>gdhB</i>	GDH SEC F	ACCACATGCTTTGTTATG	774	
	GDH SEC R	GTTGGCGTATGTTGTGC		
	GDHB 775R	GTTGAGTTGGCGTATGTTGTGC		
	GDHB 1F	GCTACTTTTATGCAACAGAGCC		
<i>recA</i>	RA1	CCTGAATCTTCYGGTAAAC	425	
	RA2	GTTTCTGGGCTGCCAACATTAC		
<i>cpn60</i>	<i>cpn60</i> _F	GGTGCTCAACTTGTTTCGTGA	640	
	<i>cpn60</i> _R	CACCGAAACCAGGAGCTTTA		
<i>gpi</i>	<i>gpi</i> _F	GAAATTTCCGGAGCTCACAA	456	
	<i>gpi</i> _R	TCAGGAGCAATACCCCACTC		
<i>rpoD</i>	<i>rpoD</i> -F	ACCCGTGAAGGTGAAATCAG	672	
	<i>rpoD</i> -R	TTCAGCTGGAGCTTTAGCAAT		

* Primers utilizados para amplificação e sequenciação dos “housekeeping genes” em *A. baumannii* segundo o esquema de Oxford (https://pubmlst.org/abaumannii/info/primers_Oxford.shtml). F, Forward; R, reverse; pb, pares de bases. MLST, “Multilocus Sequence Typing”.

Tabela 4. Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados para amplificação por e sequenciação de genes associados à resistência à colistina.

Gene	“Primers”	Sequência (5' → 3')	Fragmento (pb)	Referência
<i>pmrA</i>	pmrA_Fw	AGCGAGCCTAGAACATGACA	753	Machado <i>et al.</i> , 2018
	pmrA_Rv	GGTGCCCAAATCAGTCG		
<i>pmrB</i>	pmrB-P1_Fw	AACGACTGATTTGGGGCAC	643	
	pmrB-P1_Rv	TGCTTCTGTTTCATTTTGCGC	629	
	pmrB-P2_Fw	GCTTGCGGGCAGTATGTTGC		
	pmrB-P2_Rv	GCTTGCGGGCAGTATGTTT		
	pmrB-P3_Fw	ATTTGTGTGGAGCAGTTGGT	601	
	pmrB-P3_Rv	TTTCATGATGGGTTGGGCG		
<i>lpxA</i>	lpxA1_Fw	CGCCATTATTGATCCATCTGC	411	
	lpxA1_Rv	CCAATATGTACATGTCCAGCG	557	
	lpxA2_Fw	CCAAGATAGGTAGTCATAACCT		
	lpxA2_Rv	TCCAAAGTCTGAAGAAGCAA		
<i>lpxC</i>	lpxC1_Fw	ACAGCGTACTCTCAATCGTG	508	
	lpxC1_Rv	TGCAGACTGATACTCTTTGGCA	610	
	lpxC2_Fw	AAGCAATATTCAGCCCGCAT		
	lpxC2_Rv	CCAAGCTTTACTACGTTTGGC		
<i>lpxD</i>	lpxD1_Fw	AGGTGAGCTAATTGGTGAAGGT	651	
	lpxD1_Rv	ATAACCCCATCTTCCAAAATTGT	461	
	lpxD2_Fw	TTGATAGAGGCGCACTTGAT		
	lpxD2_Rv	AGGGATGGCAAATTTAGGTGTAGT		

Fw, Forward; Rv, reverse; pb, pares de bases.

2.1.3. Meios de cultura e soluções

O modo de preparação dos meios de cultura, soluções e compostos utilizados estão descritos nas Tabelas 5 a 8. Os meios de cultura e soluções foram preparados em água destilada e de seguida esterilizados por autoclavagem, 121°C durante 15 min a 1 bar, quando necessário.

Tabela 5. Composição dos meios de cultura.

Meio de cultura ⁽¹⁾	Composição (por litro)
Mueller-Hinton Broth (MHB)	300 g de infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g de amido; 4,347 mg Ca ²⁺ ; 6,206 mg Mg ²⁺ ; pH 7.3 ± 0,1 a 25°C
Cation-adjusted MHB (CAMHB)	300 g de infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g de amido; 25 mg Ca ²⁺ ; 12.5 mg Mg ²⁺ ; pH 7.3 ± 0,1 a 25°C
Mueller-Hinton agar (MHA)	300 g de infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g de amido; 17 g de agar; 4,347 mg Ca ²⁺ ; 6,206 mg Mg ²⁺ ; pH 7.3 ± 0,1 a 25°C

(1) Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra.

Tabela 6. Composição e preparação das soluções utilizadas.

Solução	Composição / Preparação da solução “stock”
EDTA 0,5M, pH 8.0 ⁽¹⁾	232,6 g de EDTA em 1 litro de água destilada
Tris-HCl 1M, pH 8.0 ⁽¹⁾	121,1 g de Tris-base em 1 litro de água destilada
Glicerol 50% (v/v) ⁽¹⁾	Glicerol em água bidestilada estéril
Cloreto de cálcio (CaCl ₂) ⁽¹⁾	10 mg/ml em água bidestilada estéril ⁽³⁾
Cloreto de magnésio (MgCl ₂) ⁽¹⁾	10 mg/ml em água bidestilada estéril ⁽³⁾
Soro fisiológico 0,85% ⁽²⁾	0,85 g de NaCl em 100 ml de água destilada ⁽³⁾

(1) Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A.; (2) Panreac, Barcelona, Espanha. (3) Solução esterilizada por filtração com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22 µm de diâmetro de poro da Rotilabo Spritzenfilter Steril, Karlsruhe, Alemanha. DMSO, dimetil sulfoxido.

Tabela 7. Composição e preparação das soluções-tampão utilizadas.

Solução-tampão	Composição / Preparação da solução “stock”
Tampão TE	10 mM Tris-HCl ⁽¹⁾ 1 M, 1 mM EDTA 0,5 M pH 8.0 em 1 litro de água destilada
Tampão TAE 50X	242 g de Tris base ⁽¹⁾ , 57,1 ml de ácido acético glacial ⁽²⁾ e 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8.0 em 1 litro de água destilada
Tampão amostra	0,1 g de azul de bromofenol ⁽³⁾ e 16 g de sacarose ⁽⁴⁾ em 40 ml de água bidestilada estéril
Tampão fosfato salino (PBS) 1X ⁽¹⁾	10 mM tampão fosfato; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl; pH 7.4

(1) Sigma-Aldrich; (2) Panreac, Barcelona, Espanha; (3) PlusOne, Amersham Pharmacia Biotech, Easton Turnpike, Fairfield; (4) Merck, Darmstadt, Alemanha.

Tabela 8. Composição e preparação das soluções de compostos antimicrobianos usados.

Composto ⁽¹⁾	Composição / Preparação da solução “stock”
Brometo de etídio (EtBr)	10 mg/ml em água destilada Armazenado a 4°C, ao abrigo da luz (fotossensível)
Tioridazina (TZ)	10 mg/ml em água bidestilada estéril Armazenado a -20°C, ao abrigo da luz (fotossensível)
Sulfato de colistina (COL)	10 mg/ml em água bidestilada estéril Armazenado a -20°C em tubos de vidro

(1) Sigma-Aldrich.

Tabela 9. Antibióticos, cargas e “breakpoints” usados no método de Kirby-Bauer.

Classe	Antibióticos ⁽¹⁾	Carga (µg)	“Breakpoint” (mm)		
			<R	I	≥S
Penicilinas	Ampicilina (AMP) ⁽²⁾	10	≤13	14 - 16	≥17
	Amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) ⁽²⁾	30	≤13	14 - 17	≥18
	Piperacilina (PRL)	100	≤17	18 - 20	≥21
	Piperacilina-tazobactam (TZP)	110	≤17	18 - 20	≥21
Cefalosporinas 3^aG	Oxacilina (OX) ⁽³⁾	1	-	-	-
	Ceftazidime (CAZ)	30	≤14	15 - 17	≥18
	Cefotaxime (CTX)	30	≤14	15 - 22	≥23
	Ceftriaxone (CRO)	30	≤13	15 - 17	≥21
Cefalosporinas 4^aG	Cefepime (FEP)	30	≤14	15 - 17	≥18
	Imipenem (IPM)	10	≤18	19 - 21	≥22
Carbapenemos	Meropenem (MEM)	10	≤14	15 - 17	≥18
	Doripenem (DOR)	10	≤14	15 - 17	≥18
	Aminoglicosídeos	Amicacina (AK)	30	≤14	15 - 16
Gentamicina (CN)		10	≤12	13 - 14	≥15
Netilmicina (NET) ⁽⁴⁾		10	<16	-	≥16
Tobramicina (TOB)		10	≤12	13 - 14	≥15
Tetraciclinas	Doxicilina (DO)	30	≤9	10 - 12	≥13
	Minociclina (MH)	30	≤12	13 - 15	≥16
	Tetraciclina (TE)	30	≤11	12 - 14	≥15
Glicilciclinas	Tigeciclina (TGC) ⁽⁵⁾	15	<15	-	≥18
Fluoroquinolonas	Levofloxacina (LEV)	5	≤13	14 - 16	≥17
	Ciprofloxacina (CIP)	5	≤15	16 - 20	≥21
Inibidores das vias dos folatos	Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	1,25/ 23,75	≤10	11 - 15	≥16

(1) Oxid. R, resistente; I, intermédio; S, susceptível. As abreviaturas dos antibióticos são apresentadas conforme a inscrição nos respectivos discos. (2) “Breakpoints” para *Acinetobacter* spp. não definidos, interpretação feita com base nos “breakpoints” para *Enterobacteriaceae* de acordo com as normas do CLSI (CLSI, 2018b). (3) Não existem “breakpoints” para a oxacilina para *Acinetobacter* spp. (4) “Breakpoints” de acordo com as normas do EUCAST (EUCAST, 2017). (5) “Breakpoints” para *Acinetobacter* spp. não definidos, interpretação feita com base nos “breakpoints” para *Enterobacteriaceae* de acordo com as normas do EUCAST (EUCAST, 2017).

2.2. Métodos

2.2.1. Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas

Para o crescimento dos isolados em estudo e da estirpe de referência foi usado meio MHB ou MHA. Estes foram crescidos a 37°C, durante 20-24 h. Os crescimentos em meio MHB foram realizados a 180 rpm (Thermo Scientific MaxQ 4000 Benchtop Orbital Shakers, Waltham, MA, E.U.A).

Os “stocks” das estirpes em meio líquido suplementado com 10% (v/v) de glicerol, foram mantidos a -80°C (armazenamento de longo prazo) e a -20°C (armazenamento de curto prazo).

2.2.2. Caracterização fenotípica

2.2.2.1. Teste de susceptibilidade aos antibióticos (TSA) de Kirby-Bauer

O teste de susceptibilidade foi feito com base no método de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Prepararam-se culturas primárias de todos isolados em estudo e estirpe de referência por inoculação em placas com meio MHA. As placas foram incubadas a 37°C (Heraeus, Alemanha), durante 20-24 h. A partir destas culturas, efectuaram-se culturas em 10 ml de meio líquido MHB, inoculando 3 a 4 colónias das culturas primárias, que foram de seguida incubadas a 37°C, 180 rpm, durante 20-24 h. A partir das culturas obtidas, preparou-se uma suspensão bacteriana com uma concentração celular equivalente a 0,5 na escala de McFarland em soro fisiológico 0,85% estéril. De seguida, as placas de MHA foram inoculadas por espalhamento em estrias estreitas com uma zaragatoa estéril embebida com a suspensão da estirpe a testar. As placas ficaram a repousar durante 10 min à temperatura ambiente de modo a absorver o inóculo antes de se colocarem os discos. Após este período, os discos foram colocados sobre o agar com o auxílio de uma pinça estéril, de maneira a existirem halos que não se sobrepusessem. As placas foram incubadas a 37°C, durante 20-24 h. Após este período registou-se a medida do diâmetro dos halos de inibição para cada disco de antibiótico. Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2018a), excepto quando indicado em contrário. Os discos de antibiótico utilizados, a respectiva carga e os “breakpoints” estão apresentados na Tabela 9.

2.2.2.2. Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) pelo método de diluição em microplaca de 96 poços

As CMIs da colistina (antibiótico), tioridazina (inibidor de efluxo) e brometo de etídio (substrato de bombas de efluxo) foram efectuadas por microdiluição seriada de 1:2 em placa de 96 poços de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2018a,b). A CMI é definida como a concentração mínima de um composto antimicrobiano capaz de inibir o visível crescimento de um determinado microrganismo.

Prepararam-se culturas primárias dos isolados e da estirpe de referência de *A. baumannii* em meio MHA. As placas foram incubadas a 37°C, durante 20-24 h. De seguida, foram preparadas culturas em 10 ml de meio MHB, inoculando 3 a 4 colónias das culturas primárias. As estirpes foram incubadas a 37°C, 180 rpm, durante 20-24 h. A densidade do inóculo das estirpes foi ajustada em meio CAMHB (do inglês “Cation-adjusted MHB”), de forma a obter uma turbidez equivalente a 0,5 McFarland. A colistina foi testada de 256 a 0,0078 µg/ml, o brometo de etídio foi testado de 256 a 0,5 µg/ml e a tioridazina foi testada de 64 a 0,125 µg/ml. A gama de concentrações foi seleccionada com base em resultados previamente obtidos no grupo de trabalho (Machado *et al.*, 2018). Depois de preparadas as soluções de trabalho dos compostos em estudo, prepararam-se as placas de 96 poços como demonstrado na Figura 6.



Figura 6. Esquema representativo de uma microplaca de 96 poços para a determinação das CMIs. Diluição seriada de 1:2. TZ, tioridazina; COL, colistina; EtBr, brometo de etídio.

Inicialmente colocou-se 100 µl de meio CAMHB em todos os poços da placa. Acrescentou-se 100 µl de meio CAMHB nos poços da coluna 1 correspondente ao controlo negativo (controlo de esterilidade). De seguida, pipetou-se 100 µl da solução de composto, preparado 4x mais concentrado que a concentração mais elevada pretendida, aos poços correspondentes da coluna 3. Efectuaram-se diluições seriadas de 1:2, retirando-se 100 µl dos poços da coluna 3 para os poços da coluna 4 e assim

sucessivamente até à coluna 12, descartando-se os 100 µl restantes da coluna 12. Por último, adicionou-se 100 µl de inóculo previamente ajustado a 0,5 McFarland a todas as colunas excepto à coluna 1. A coluna 2 corresponde ao controlo positivo (controlo de crescimento). No final, cada poço apresentava um volume final de 200 µl. A leitura dos resultados foi efectuada visualmente após 20-24 h de incubação a 37°C. Foram considerados válidos os ensaios que apresentavam crescimento no poço correspondente ao controlo positivo, e ausência de crescimento no poço correspondente ao controlo negativo. Os ensaios foram realizados em triplicado. O valor de CMI é dado como o resultado de pelo menos dois valores concordantes.

2.2.2.3. Determinação de CMIs na presença de inibidores de efluxo pelo método de “checkerboard”

Para avaliar a existência de actividade de efluxo activo nas estirpes em estudo, determinaram-se as CMIs pelo método de diluição por “checkerboard” em microplaca de 96 poços para a colistina e brometo de etídio na presença do inibidor de efluxo tioridazina (Figura 7). A tioridazina foi escolhida como inibidor de efluxo para este trabalho, pois é o inibidor que mais potencia a acumulação de EtBr em *A. baumannii* (Antunes, 2018; Machado *et al.*, 2018). Os ensaios foram realizados de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.2.2.2, com a excepção de que antes da adição do inóculo, foram adicionados 10 µl de tioridazina a todos os poços desde a coluna 3 à coluna 12. A tioridazina foi testada em concentrações subinibitórias (22,5 µM a 0,7 µM) (Figura 7) de modo a não comprometer a permeabilidade da membrana celular e a sua viabilidade (Machado *et al.*, 2018). Deste modo, inibe-se apenas a actividade de efluxo, caso exista, sem afectar a viabilidade celular. Os ensaios foram realizados em triplicado. O valor de CMI é dado como o resultado de pelo menos dois valores concordantes.



Figura 7. Esquema representativo de uma placa de 96 poços para a determinação do efeito sinérgico entre a tioridazina e a colistina e o brometo de etídio. TZ, tioridazina; COL, colistina; EtBr, brometo de etídio.

De forma a avaliar o efeito do inibidor de efluxo nas CMI's da colistina e brometo de etídio determinou-se o factor de modulação (FM) (Gröblacher *et al.*, 2012), através da seguinte fórmula:

$$FM = \frac{CMI \text{ antibiótico}}{CMI \text{ em combinação}}$$

Considerou-se significativo o decréscimo de pelo menos $\frac{1}{4}$ do valor da CMI dos compostos na presença do inibidor de efluxo tioridazina (DeMarco *et al.*, 2007).

2.2.3. Caracterização genotípica

2.2.3.1. Extracção e quantificação de DNA

Para a extracção de DNA dos isolados em estudo e estirpe de referência foi usado uma adaptação do método de lise térmica descrito por Reischl *et al.* (2000), por ser um método rápido e menos dispendioso, embora o DNA extraído não esteja puro. Foram efectuadas culturas primárias em meio MHA, 37°C, durante 20-24 h. Após este período, ressuspendeu-se uma ansa cheia de colónias em 750 µl de tampão TE e centrifugou-se a 4°C, 13000 rpm (Sigma 3K18, Shropshire, Reino Unido), durante 5 min. O sobrenadante

foi desprezado e o sedimento foi ressuspendido em 500 µl de tampão TE, homogeneizado no vórtex e centrifugado nas mesmas condições. De seguida, ressuspendeu-se o sedimento em 100 µl de tampão TE e incubou-se a 100°C em banho seco (QBA1, Grant, Shepreth Cambridgeshire). De seguida, o lisado foi centrifugado a 4°C, 13000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi recolhido e guardado a 4°C (para utilização a curto prazo) ou -20°C (para utilização a longo prazo). O DNA extraído foi quantificado num Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific).

2.2.3.2. ERIC-PCR

A tipagem molecular dos isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes a colistina foi realizada pela técnica de ERIC-PCR (Versalovic *et al.*, 1991). Para tal, prepararam-se as misturas de reacção que consistiram em: 1X tampão da enzima NZY Taq II DNA Polimerase (NZYTech), 1,75 mM de MgCl₂ (NZYTech), 0,2 mM de cada dNTP (NZYTech), 40 pmol de cada “primer” (Tabela 3), 1 U de NZY Taq II DNA Polimerase (NZYTech), 100 ng de DNA e água MilliQ. Para cada reacção preparou-se um tubo adicional com todos os reagentes excepto o DNA, o qual serviu de controlo de possíveis contaminações durante a reacção de amplificação. As reacções de PCR decorreram num termociclador Biometra Uno II (Gottingen, Alemanha). A reacção de amplificação realizou-se com o seguinte perfil de amplificação: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, emparelhamento dos “primers” a 50°C por 1 min, e extensão a 72°C por 2 min. A extensão final ocorreu a 72°C durante 10 min. Os produtos de amplificação foram armazenados a 4°C até serem utilizados.

Os produtos de amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose SeaKem Gold a 2% (p/v) (Lonza, Basileia, Suíça) dissolvida em tampão TAE 1X. A electroforese decorreu em tampão TAE 1X, a 65 V, 90 mA, durante 1.5 h com o sistema Wide Minisub Cell GT (Bio-Rad, Milão, Itália) e fonte de alimentação Amersham Pharmacia Biotech EPS 301 (Little Chalfont, Reino Unido). Após a electroforese, o gel de agarose foi corado com 1 µg/ml de brometo de etídio durante 30 min. A análise dos produtos amplificados foi realizada utilizando-se como parâmetro de comparação o marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder VII (NZYTech). O resultado da amplificação foi visualizado sob luz UV com o sistema Gel Doc XR (Bio-Rad).

A análise da similaridade genética e construção do dendrograma foi realizada com base nos perfis electroforéticos obtidos pelo ERIC-PCR usando o “software” PyElph 1.4 (Pavel e Vasile, 2012) com base no coeficiente de Dice (1945), e uma tolerância de 2%. O método de “clustering” usado foi o UPGMA (do inglês “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”).

2.2.3.3 Tipagem por MLST

O método de MLST (do inglês “Multilocus Sequence Typing”) consiste num método de tipagem genética de alta resolução de modo a caracterizar epidemiologicamente estirpes patogénicas clinicamente importantes (Bartual *et al.*, 2005; Maiden *et al.*, 1998). A caracterização da diversidade genética de estirpes bacterianas, baseia-se na amplificação e sequenciação de sete “housekeeping genes”, ou seja, genes essenciais para o desempenho de funções metabólicas básicas na célula. A cada gene, característico de determinada espécie ou estirpe, é atribuído um número de alelo e o conjunto dos números dos sete alelos constitui um perfil alélico ou “sequence type” (ST). Estes STs, quando comparados, permitem avaliar a variabilidade genética dentro e entre populações, podendo também fornecer informações sobre o fluxo genético (Pérez Losada *et al.*, 2013).

A variabilidade dos genes *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* e *rpoD* foi analisada através da sua amplificação parcial com os “primers” específicos para *A. baumannii* descritos na Tabela 3. As misturas de reacção foram preparadas para um volume total de 50 µl composta por: 1X tampão da enzima NZY Taq II DNA Polimerase (NZYTech), 1,5 mM MgCl₂ (NZYTech), 0,2 mM de cada dNTP (NZYTech), 20 pmol de cada “primer”, 1 U NZY Taq II DNA Polimerase (NZYTech), 100 ng de DNA e água MilliQ. Para cada reacção preparou-se um tubo adicional com todos os reagentes excepto o DNA, o qual serviu de controlo de possíveis contaminações durante a reacção de amplificação.

As reacções de amplificação decorreram num termociclador Eppendorf AG Mastercycler nexus (Hamburgo, Alemanha), com o seguinte perfil de amplificação: desnaturação inicial a 94°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, emparelhamento dos “primers” a 55°C durante 1 min e extensão a 72°C durante 1 min. A extensão final ocorreu a 72°C durante 2 min. Findo este processo, os produtos de amplificação mantiveram-se a 4°C até serem utilizados.

Após a reacção de PCR, verificou-se a eficiência da amplificação, bem como a integridade dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) (Sigma) dissolvida em tampão TAE 1X, e corada com 1 µg/ml de brometo de etídio (Sigma). A electroforese decorreu a uma voltagem de 120 V e 150 mA durante 40 min com o sistema Wide Minisub Cell GT (Bio-Rad) e fonte de alimentação Amersham Pharmacia Biotech EPS 301. A análise dos produtos amplificados foi realizada utilizando-se como parâmetro de comparação o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder VII (NZYTech). O resultado da amplificação foi registado sob luz UV pelo sistema GEL DOC XR (Bio-Rad).

Os produtos de amplificação foram sequenciados em ambas as cadeias usando os “primers” usados na amplificação por PCR, com excepção do gene *gdhB* (Tabela 3). As sequências obtidas foram editadas e analisadas usando o programa de análise de sequências ChromasPro 2.0.0 (Technelysium, Austrália), e comparadas com as sequencias das estirpes *A. baumannii* depositadas na base dados PubMLST disponível online em:

https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_abaumannii_oxford_seqdef&set_id=1&page=sequence_query.

Para a identificação dos STs foi utilizado o programa PubMLST disponível online em:

https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_abaumannii_isolates&page=profiles.

2.2.3.4. Detecção de mutações em genes associados à resistência à colistina

A presença de mutações nos genes *lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, *pmrA* e *pmrB*, nas estirpes resistentes à colistina, foi analisada com os “primers” específicos para *A. baumannii* descritos na Tabela 4. As misturas de reacção foram preparadas para um volume total de 50 µl composta por: 1X tampão da enzima NZY Taq II DNA Polimerase (NZYTech), 1,5 mM MgCl₂ (NZYTech), 0,2 mM de cada dNTP (NZYTech), 10 pmol de cada “primer”, 1 U NZY Taq II DNA Polimerase (NZYTech), 100 ng de DNA e água MilliQ. Para cada reacção preparou-se um tubo adicional com todos os reagentes excepto o DNA, o qual serviu de controlo de possíveis contaminações durante a reacção de amplificação. A reacção de PCR foi realizada num termociclador Biometra UNO II, com o seguinte perfil de amplificação: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 s, emparelhamento dos “primers” a 52°C durante 30 s e extensão a 72°C durante 30 s. A extensão final ocorreu a 72°C durante 10 min. Findo este processo, as amostras mantiveram-se a 4°C até serem utilizadas.

Após a reacção de PCR, verificou-se a eficiência da amplificação, bem como a integridade dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) (Sigma) dissolvida em tampão TAE 1X, e corada com 1 µg/ml de brometo de etídio (Sigma). A electroforese decorreu a uma voltagem de 120 V e 150 mA, durante 40 min com o sistema Mini Sub Cell GT (Bio-Rad) e fonte de alimentação Amersham Pharmacia Biotech EPS 301. A análise dos produtos amplificados foi realizada utilizando-se como parâmetro de comparação o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder VII (NZYTech). O resultado da amplificação foi registado sob luz UV pelo sistema GEL DOC XR (Bio-Rad).

Os produtos de amplificação foram sequenciados em ambas as cadeias usando os “primers” usados na amplificação por PCR (Tabela 4). As sequências obtidas foram editadas e analisadas usando o programa de análise de sequências ChromasPro 2.0.0 e comparadas com as sequencias da estirpe de referência *A. baumannii* ATCC17978 (numero de acesso: CP000521) usando o programa Clustal Omega disponível online em <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Sievers *et al.*, 2012).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização do padrão de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados *A. baumannii* em estudo

De modo a determinar o perfil de susceptibilidade dos 74 isolados de *A. baumannii* efectuamos antibiogramas através do método de difusão em disco de Kirby-Bauer, com excepção da colistina, cuja susceptibilidade foi determinada por determinação da CMI por microdiluição em placa de 96 poços uma vez que este é o método de referência para este antibiótico (EUCAST, 2017). Embora o método de microdiluição seja o método de referência, o teste de susceptibilidade à colistina em contexto de rotina laboratorial hospitalar, é normalmente realizado pelo método de E-test por ser mais expedito. Deste modo, neste trabalho não nos foi possível observar a presença de subpopulações resistentes a colistina, que irão ser analisadas posteriormente.

Foram escolhidos para este estudo os antibióticos geralmente usados na terapêutica de infecções por *A. baumannii*. Incluímos também antibióticos que se sabe serem substratos de efluxo como, p.e., a oxacilina. As penicilinas foram incluídas como controlos uma vez que *A. baumannii* é-lhes naturalmente resistente (Jones *et al.*, 2007; Karageorgopoulos *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2008). A estirpe de referência *A. baumannii* ATCC19606^T foi usada como controlo em todos os ensaios. Os resultados obtidos encontram-se detalhados na Tabela 10.

Tabela 10. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos das estirpes de *A. baumannii* em estudo, determinado pelo método de Kirby-Bauer.

Estirpe	AMP ¹	AMC ¹	OX ²	PRL	TZP	CAZ	FEP	CTX	CRO	DOR	IMP	MEM	CN	TOB	AK	NET	DO	MH	TE	TGC	LEV	CIP	SXT	
ATCC	R	R	R	I	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	
Ab08-1	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-2	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
Ab08-3	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	I	R	R
Ab08-4	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	R	R	R
Ab08-5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R
Ab08-6	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Ab08-7	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Ab08-8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	R	S	S	R	R	R
Ab08-9	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-10	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-11	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	I	R	R
Ab08-12	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-13	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R
Ab08-14	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S
Ab08-15	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-16	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R
Ab08-17	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-18	R	R	R	I	R	S	S	R	I	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Ab08-19	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-20	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R
Ab08-21	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R
Ab08-22	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R
Ab08-23	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R
Ab08-24	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-25	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
Ab08-26	R	I	R	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ab08-27	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-28	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R
Ab08-29	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-30	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R
Ab08-31	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-32	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-33	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-34	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-35	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab08-36	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R
Ab09-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R
Ab09-2	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
Ab09-3	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R
Ab09-4	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	I	S	S	R	R	R
Ab09-5	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S
Ab09-6	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	R	R	R
Ab09-7	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R
Ab09-8	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
Ab09-9	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
Ab09-10	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	I	R	R	R
Ab09-11	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	R	R	R
Ab09-12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R
Ab09-13	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R

Tabela 10 (cont). Perfil de susceptibilidade aos antibióticos das estirpes de *A. baumannii* em estudo, determinado pelo método de Kirby-Bauer.

Estirpe	AMP ¹	AMC ¹	OX ²	PRL	TZP	CAZ	FEP	CTX	CRO	DOR	IMP	MEM	CN	TOB	AK	NET	DO	MH	TE	TGC	LEV	CIP	SXT
Ab09-14	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	I	R	R	R
Ab09-15	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R
Ab09-16	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	I	R	R	S
Ab09-17	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	R
Ab09-18	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R
Ab09-19	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R	R
Ab09-20	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R
Ab09-21	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S
Ab09-22	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	I	S	R	R	R
Ab09-23	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S
Ab09-24	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R
Ab09-25	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Ab09-26	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R
Ab09-27	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	I	R	S
Ab09-28	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	I	R	R
Ab09-29	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	I	R	R
Ab09-30	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R
Ab09-31	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S
Ab09-32	R	S	R	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ab10-1	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	R	S	R	R	R
Ab10-2	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	R	S	R	R	R
Ab10-3	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	R	S	R	R	R
Ab10-4	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	I	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S
Ab10-5	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R
Ab10-6	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	R

R – resistente; I – intermédio; S – susceptível; AMP- ampicilina; AMC - amoxicilina/ácido clavulânico; OX – oxacilina; PRL – piperacilina; TZP - piperacilina-tazobactam; CAZ – ceftazidime; FEP – cefepime; CTX – cefotaxime; CRO – ceftriaxone; DOR – doripenem; IMP - imipenem; MEM – meropenem; CN – gentamicina; TOB – tobramicina; AK – amicacina; NET – netilmicina; DO – doxicilina; MH – minociclina; TE – tetraciclina; TGC – tigeciclina; LEV – levofloxacina; CIP – ciprofloxacina; SXT - trimetoprim-sulfametoxazol.

A rosa estão representados a antibióticos pertencentes à classe das penicilinas; verde escuro, cefalosporinas (CAZ, CTX e CRO cefalosporinas de 3ª geração, FEP, de 4ª geração); amarelo, carbapenemos; laranja, aminoglicosídeos; verde claro, tetraciclina; azul claro, gliciliclinas; vermelho, fluoroquinolonas; azul escuro, inibidores das vias dos folatos.

¹ "Breakpoints" para *Acinetobacter* spp. não definidos, interpretação feita com base nos "breakpoints" para *Enterobacteriaceae* de acordo com as normas do CLSI (CLSI, 2018b); ² Não existem "breakpoints" de oxacilina para *Acinetobacter* spp., considerou-se resistente devido à ausência de halo; ³ "Breakpoints" de acordo com as normas do EUCAST (EUCAST, 2017); ⁴ "Breakpoints" para *Acinetobacter* spp. não definidos, interpretação feita com base nos "breakpoints" para *Enterobacteriaceae* de acordo com as normas do EUCAST (EUCAST, 2017).

Na Tabela 11 apresentam-se as CMI's da colistina determinadas pelo método de microdiluição em placa de 96 poços.

Tabela 11. Valores de CMI obtidos da colistina para as estirpes em estudo.

Estirpe	Colistina (µg/ml)	Fenótipo	Estirpe	Colistina (µg/ml)	Fenótipo
ATCC	0,25	S	Ab09-2	0,0625	S
Ab08-1	0,0625	S	Ab09-3	0,0625	S
Ab08-2	0,125	S	Ab09-4	0,5	S
Ab08-3	0,03125	S	Ab09-5	0,125	S
Ab08-4	0,03125	S	Ab09-6	0,00315	S
Ab08-5	0,125	S	Ab09-7	0,5	S
Ab08-6	0,25	S	Ab09-8	0,125	S
Ab08-7	0,125	S	Ab09-9	0,0625	S
Ab08-8	0,0625	S	Ab09-10	0,25	S
Ab08-9	>256	R	Ab09-11	0,0625	S
Ab08-10	0,125	S	Ab09-12	0,125	S
Ab08-11	0,125	S	Ab09-13	1	S
Ab08-12	0,125	S	Ab09-14	0,25	S
Ab08-13	0,0156	S	Ab09-15	0,125	S
Ab08-14	0,5	S	Ab09-16	0,125	S
Ab08-15	0,5	S	Ab09-17	0,03125	S
Ab08-16	0,0625	S	Ab09-18	0,125	S
Ab08-17	0,125	S	Ab09-19	0,0625	S
Ab08-18	0,125	S	Ab09-20	0,0625	S
Ab08-19	0,125	S	Ab09-21	0,03125	S
Ab08-20	0,03125	S	Ab09-22	0,0625	S
Ab08-21	0,03125	S	Ab09-23	0,0625	S
Ab08-22	0,25	S	Ab09-24	0,0625	S
Ab08-23	0,03125	S	Ab09-25	0,0156	S
Ab08-24	0,25	S	Ab09-26	0,03125	S
Ab08-25	>256	R	Ab09-27	0,03125	S
Ab08-26	0,0625	S	Ab09-28	0,5	S
Ab08-27	0,25	S	Ab09-29	0,125	S
Ab08-28	0,03125	S	Ab09-30	0,0625	S
Ab08-29	0,125	S	Ab09-31	0,0315	S
Ab08-30	0,125	S	Ab09-32	<0,0078	S
Ab08-31	0,125	S	Ab10-1	64	R
Ab08-32	0,125	S	Ab10-2	64	R
Ab08-33	0,0625	S	Ab10-3	128	R
Ab08-34	0,0625	S	Ab10-4	>256	R
Ab08-35	0,125	S	Ab10-5	128	R
Ab08-36	0,25	S	Ab10-6	128	R
Ab09-1	0,0156	S			

A vermelho denota-se as estirpes resistentes à colistina. Breakpoints para a colistina: ≤ 2 µg/ml, susceptível e >2 µg/ml, resistente (EUCAST, 2017).

A caracterização fenotípica dos 74 isolados, obtida através da realização do TSA e determinação das CMI's para a colistina, permitiu avaliar a susceptibilidade aos

antibióticos de diferentes classes, e em particular, aos carbapenemos e colistina. Na Tabela 12 apresentam-se o número total de isolados (%) por classe em cada categoria - susceptível, intermédio ou resistente.

Tabela 12. Perfil de susceptibilidade combinado aos antibióticos das 74 estirpes de *A. baumannii* em estudo, determinado pelo método de Kirby-Bauer.

Classe	Antibióticos	S	I	R
Penicilinas	AMP	-	-	74 (100%)
	AMC	1 (1,4%)	-	73 (98,6%)
	OX	-	-	74 (100%)
	PRL	2 (2,7%)	-	72 (97,3%)
	TZP	2 (2,7%)	-	72 (97,3%)
Cefalosporinas 3ª geração	CTX	-	2 (2,7%)	72 (97,3%)
	CRO	-	3 (4,1%)	71 (95,9%)
	CAZ	16 (21,7%)	32 (43,2%)	26 (35,1%)
Cefalosporinas 4ª geração	FEP	40 (54,1%)	24 (32,4%)	10 (13,5%)
Carbapenemos	DOR	2 (2,7%)	1 (1,4%)	71 (95,9%)
	IMP	2 (2,7%)	-	72 (97,3%)
	MEM	2 (2,7%)	-	72 (97,3%)
Aminoglicosídeos	CN	30 (40,6%)	10 (13,5%)	34 (45,9%)
	TOB	54 (72,9%)	-	20 (27,1%)
	AK	44 (59,5%)	1 (1,4%)	29 (39,1%)
	NET	18 (24,3%)	-	56 (75,7%)
Tetraciclina	DO	65 (87,8%)	8 (10,8%)	1 (1,4%)
	MH	74 (100%)	-	-
	TE	45 (60,8%)	3 (4,1%)	26 (35,1%)
Glicilciclina	TGC	68 (91,8%)	3 (4,1%)	3 (4,1%)
Fluoroquinolonas	LEV	3 (4,1%)	23 (31,1%)	48 (64,8%)
	CIP	2 (2,7%)	-	72 (97,3%)
Inibidores das vias dos folatos	SXT	10 (13,5%)	-	64 (86,5%)
Polimixinas*	COL	66 (89,2%)	-	8 (10,8%)

AMP- ampicilina; AMC - amoxicilina/ácido clavulânico; OX – oxacilina; PRL – piperacilina; TZP - piperacilina-tazobactam; CAZ – ceftazidime; FEP – cefepime; CTX – cefotaxime; CRO – ceftriaxone; DOR – doripenem; IMP - imipenem; MEM – meropenem; CN – gentamicina; TOB – tobramicina; AK – amicacina; NET – netilmicina; DO – doxicilina; MH – minociclina; TE – tetraciclina; TGC – tigeciclina; LEV – levofloxacina; CIP – ciprofloxacina; SXT - trimetoprim-sulfametoxazol; COL, colistina. A vermelho denota-se o número de estirpes resistentes à colistina. Breakpoints para a colistina: ≤ 2 µg/ml, susceptível e >2 µg/ml, resistente (EUCAST, 2017).

Verifica-se que todas as estirpes, com excepção da Ab09-32, são resistentes às penicilinas inclusive à oxacilina, um substrato de efluxo. 72 dos 74 isolados são MDR,

i.e., apresentam resistência a pelo menos 3 classes de antibióticos. Relativamente às cefalosporinas de 3ª geração, a grande maioria é resistente à CRO e CTX e 26 isolados são resistentes a CAZ. 72 dos 74 isolados são resistentes aos carbapenemos verificando-se assim uma taxa de estirpes XDR de 97,3%.

66 isolados dos 74 estudados apresentam susceptibilidade à colistina obtendo-se uma taxa de estirpes totalmente resistentes (TDR) de 10,8%. Os níveis de resistência à colistina para as estirpes susceptíveis variaram entre $<0,0078 \mu\text{g/ml}$ e $1 \mu\text{g/ml}$. Concentrações séricas de $2 \mu\text{g/ml}$ de colistina têm sido sugeridas como “breakpoint” clínico para isolados com CMIs $\leq 1 \mu\text{g/ml}$. A esta concentração, a actividade antimicrobiana é maximizada enquanto minimiza o risco de nefrotoxicidade e aumenta a probabilidade de sucesso terapêutico (Landersdorfer *et al.*, 2015). Relativamente às oito estirpes resistentes, os valores de CMI variaram entre $64 \mu\text{g/ml}$ e $>256 \mu\text{g/ml}$. Estudos publicados na literatura indicam que a resistência à colistina em isolados com CMIs $> 32 \mu\text{g/ml}$ se deve à presença de mutações em genes associados a resistência a este antibiótico (Arroyo *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2009; Beceiro *et al.*, 2011; Moffatt *et al.*, 2010). A taxa de estirpes resistentes à colistina, obtida neste trabalho difere dos dados reportados noutros trabalhos, realizados entre 2001 e 2011, e que inclui vários laboratórios da Europa, Ásia, América Latina, região da Ásia-Pacífico e E.U.A (Yau *et al.*, 2009; Gales *et al.*, 2011), que sugerem que a taxa de resistência a colistina em *A. baumannii* é bastante baixa, rondando os 0,9% a 3,3%. No nosso estudo, embora seja uma amostra de conveniência, registamos uma taxa de resistência à colistina de 10,8%, bastante superior à reportada nos estudos acima mencionados que, por sua vez, também apresentam uma enorme disparidade no número de isolados analisados, 30 isolados (Yau *et al.*, 2009) vs 4686 isolados (Gales *et al.*, 2011). No entanto, são muito poucos os estudos que analisam a taxa de resistência a colistina em isolados clínicos de *A. baumannii*, não nos sendo possível retirar conclusões mais precisas. No seu conjunto, estes dados evidenciam a necessidade de estudos que se debrucem sobre a epidemiologia da resistência à colistina em *A. baumannii*.

3.2. Determinação de concentrações mínimas inibitórias para compostos antimicrobianos na presença e ausência de tioridazina

Para a avaliação da contribuição do efluxo na resistência à colistina nos isolados de *A. baumannii* em estudo, determinamos a CMI da colistina (Tabela 11, pág. 32),

brometo de etídio (substrato de efluxo) e de tioridazina, por ser o inibidor mais eficaz na inibição da actividade de efluxo em *A. baumannii* (Antunes, 2018; Machado *et al.*, 2018). Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 13. Valores de CMIs da colistina, brometo de etídio e tioridazina para as estirpes clínicas de *A. baumannii* resistentes a colistina.

Estirpe	CMI (µg/ml)		
	COL	EtBr	TZ
ATCC19606	0,25	256	32
Ab08-9	>256	128	64
Ab08-25	>256	128	64
Ab10-1	64	256	32
Ab10-2	64	256	64
Ab10-3	128	256	64
Ab10-4	>256	256	64
Ab10-5	128	128	64
Ab10-6	128	256	64

CMI, concentração mínima inibitória; COL, colistina; EtBr, Brometo de etídio; TZ, Tioridazina.

Da análise da Tabela 13, verifica-se que todos os isolados, bem como a estirpe de referência apresentam CMIs idênticas em relação ao inibidor de efluxo tioridazina (32-64 µg/ml) e ao brometo de etídio (128-256 µg/ml) com valores de CMI bastante elevados. Não considerámos significativas variações de uma diluição nos valores de CMI, uma vez que estes podem dever-se ao erro associado a técnica usada para determinação das CMIs. Estes resultados indicam que quer a tioridazina quer o brometo de etídio requerem maiores concentrações para exercer a sua actividade antimicrobiana quando comparado, p.e., com a CMI da colistina para a estirpe ATCC19606. Relativamente à colistina, todos os isolados apresentam resistência, entre moderada e alto nível, com valores de CMI muito acima do “breakpoint” de resistência de 2 µg/ml (EUCAST, 2017) como mencionado anteriormente. A estirpe de referência apresenta-se susceptível a colistina.

Para a avaliação da contribuição do efluxo na resistência à colistina nos isolados de *A. baumannii* em estudo utilizámos a determinação de CMIs através do método de “checkerboard” da colistina e brometo de etídio na presença de tioridazina. Na Tabela 14 encontram-se os resultados de sinergismo entre a colistina e o brometo de etídio na presença de tioridazina. A concentração máxima de tioridazina testada foi de 22,5 µM de modo a não interferir com a permeabilidade celular (Machado *et al.*, 2018).

Tabela 14. Valores de CMI da colistina e brometo de etídio na presença e na ausência de tioridazina para as estirpes em estudo e determinação do factor de modulação (MF) entre colistina e tioridazina e brometo de etídio e tioridazina.

Estirpe	CMI colistina (µg/ml)/ MF						
	Sem TZ	Com TZ					
		22,5	11,3	5,6	2,8	1,4	0,7
ATCC19606	0,25	<0,0078 (↓≥32x)	<0,0078 (↓≥32x)	0,0156 (↓16x)	0,0312 (↓8x)	0,125 (↓2x)	0,125 (↓2x)
Ab08-9	>256	16 (↓≥16x)	128 (↓≥2x)	256 (↓≥2x)	>256 (↓≥2x)	>256 (↓≥2x)	>256 (↓≥2x)
Ab08-25	>256	128 (↓≥2x)	>256 (↓≥2x)	>256 (↓≥2x)	>256 (↓≥2x)	>256 (↓≥2x)	>256 (↓≥2x)
Ab10-1	64	0,5 (↓128x)	0,5 (↓128x)	0,5 (↓128x)	1 (↓64x)	8 (↓8x)	16 (↓4x)
Ab10-2	64	0,5 (↓128x)	0,5 (↓128x)	4 (↓16x)	8 (↓8x)	16 (↓4x)	32 (↓2x)
Ab10-3	128	0,5 (↓256x)	0,5 (↓256x)	1 (↓128x)	1 (↓128x)	16 (↓8x)	16 (↓8x)
Ab10-4	>256	8 (↓≥64x)	32 (↓≥16x)	64 (≥8x)	256 (↓≥2x)	256 (↓≥2x)	256 (↓≥2x)
Ab10-5	128	32 (↓4x)	64 (↓2x)	128	128	128	128
Ab10-6	128	2 (↓64x)	32(↓4x)	64 (↓2x)	64 (↓2x)	64 (↓2x)	64 (↓2x)
Estirpe	CMI EtBr (µg/ml)						
	Sem TZ	Com TZ					
		22,5	11,3	5,6	2,8	1,4	0,7
ATCC19606	256	256	256	256	256	256	256
Ab08-9	128	64 (↓2x)	128	128	128	128	128
Ab08-25	128	64 (↓2x)	128	128	128	128	128
Ab10-1	256	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)
Ab10-2	256	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)
Ab10-3	256	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)
Ab10-4	256	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)
Ab10-5	128	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)	128 (↓2x)
Ab10-6	256	256	256	256	256	256	256

CMI, concentração mínima inibitória; COL, colistina; EtBr, brometo de etídio; MF, modula TZ, tioridazina. A “bold” encontram-se as diminuições de CMI iguais ou acima de 4x.

O efeito inibitório da tioridazina foi quantificado através da determinação do factor de modulação (FM) que reflecte a redução do valor da CMI de um dado composto na presença de um inibidor de efluxo (Groblacher *et al.*, 2012). Valores de FM iguais ou superiores a 4, na presença de um inibidor de efluxo, indicam existência de actividade de efluxo em relação ao substrato que está a ser avaliado. Observa-se que, no geral, a tioridazina apresenta elevado efeito inibitório quando testada de 22,5 μM a 0,7 μM , promovendo uma redução nos valores de CMI da colistina entre $\geq 2x$ a 256x, para as estirpes Ab10-1 a Ab10-4. Relativamente às restantes estirpes, a tioridazina promoveu uma redução nos valores de CMI da colistina para a estirpe ATCC19606 entre 8x a $\geq 32x$ quando testada entre 22,5 μM a 2,8 μM , para a estirpe Ab10-5 apenas teve efeito inibitório a 22,5 μM e para a estirpes Ab10-6, a 22,5 μM e 11,3 μM .

Relativamente ao brometo de etídio, verificou-se que na generalidade dos casos, a presença de tioridazina diminui o seu valor de CMI em 2x, com excepção das estirpes ATCC19606 e Ab10-6, para as quais não se observou qualquer efeito inibitório. A determinação de CMIs de compostos antimicrobianos na presença de um inibidor de efluxo é um método indirecto para determinar a actividade de efluxo a longo prazo (18 h). Neste método é avaliado o efeito dos inibidores de efluxo em conjunto com um antibiótico, misturando-se dois mecanismos de acção que podem ser sinérgicos a longo prazo e não obrigatoriamente envolver apenas a inibição do efluxo quando comparado com os métodos fluorométricos que medem directamente a actividade de efluxo em tempo real e num curto período de tempo (30 min) (Antunes, 2018). A concentração de tioridazina utilizada corresponde a $< 1/4$ da sua CMI. No entanto, sabe-se que a tioridazina é um inibidor energético que tem um efeito inibitório muito rápido que, ao longo do tempo vai diminuindo, podendo assim explicar a ausência de efeito sinérgico a longo prazo como o observado com brometo de etídio (Machado *et al.*, 2017). Trabalho futuro a realizar inclui o estudo da actividade de efluxo destas estirpes por fluorimetria em tempo real de modo a analisar a capacidade destas estirpes em reter (ensaio de acumulação) e efluxar (ensaio de efluxo) brometo de etídio. Para além disso, é também necessária a análise dos níveis de mRNA de genes que codificam bombas de efluxo na presença e na ausência de colistina e brometo de etídio.

3.3. Avaliação da relação genética entre os isolados resistentes à colistina

Para avaliar os perfis genômicos e relação genética entre os oito isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes à colistina utilizaram-se os métodos de tipagem molecular ERIC-PCR e MLST. Para analisar a relação genética local entre estas estirpes, seleccionamos a técnica de ERIC-PCR por ser uma técnica rápida e de baixo custo. Apesar de alguns autores sugerirem que esta técnica possui baixa reprodutibilidade e capacidade discriminatória (Casarez *et al.*, 2007; Adamus-Bialek *et al.*, 2011), com base na experiência do nosso laboratório, quando efectuada em condições padronizadas, providência resultados reprodutíveis permitindo comparações intra-laboratoriais com boa capacidade discriminatória, embora não permita comparações inter-laboratoriais. Assim, por ERIC-PCR foi possível distinguir seis padrões de bandas (A a G) com diferenças ao nível do peso molecular de uma a três bandas revelando-se assim bastante próximos (Figura 8). Verificou-se que na maioria dos casos os perfis determinados são restritos a apenas um isolado com excepção de três isolados apresentam o mesmo padrão de bandas, o C, correspondendo aos isolados Ab10-1, Ab10-2 e Ab10-3 e que diferem em apenas 1 banda do isolado Ab10-5 (coluna 7) entre ≈ 900 e 1000 pb, que não está presente nesta estirpe. Apesar de não ser evidente, a estirpe Ab10-1 (coluna 3) possui esta banda embora muito fraca, resultado que foi consistente entre as várias repetições do ensaio para esta estirpe. As estirpes Ab10-4 (coluna 6) e Ab10-6 (coluna 8) diferem entre si em apenas uma banda ao nível dos 1600 pb, presente na estirpe Ab10-4 e ausente na estirpe Ab10-6. As estirpes Ab08-9 (coluna 1) e Ab08-25 (coluna 2) diferem entre si em três bandas: ≈ 2000 pb, ≈ 1200 e ≈ 900 pb, presentes na estirpe Ab08-25 e ausentes na estirpe Ab08-9. A estirpe de referência ATCC19606 apresenta um perfil único.

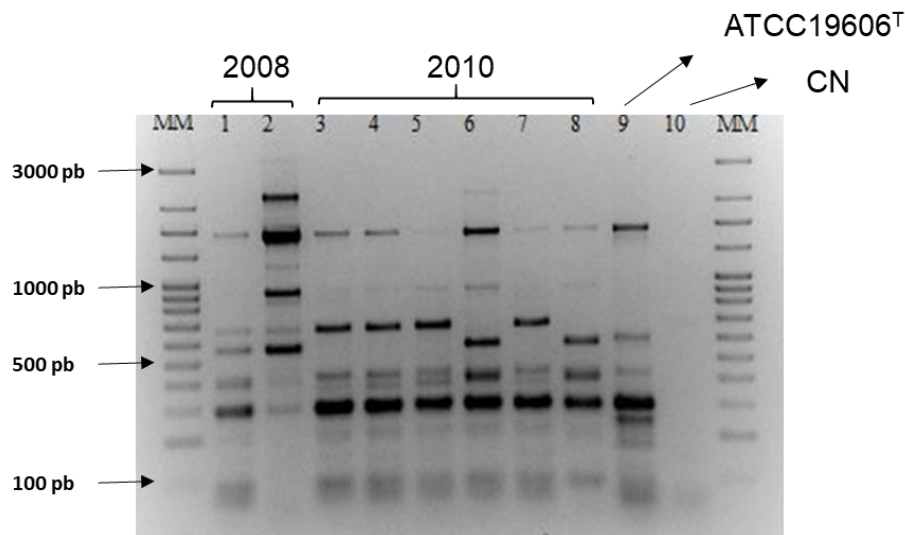


Figura 8. Perfil de ERIC-PCR obtido para cada um dos oito isolados clínicos e estirpe de referência de *A. baumannii*. 1, Ab08-9; 2, Ab08-25; 3, Ab10-1; 4, Ab10-2; 5, Ab10-3; 6, Ab10-4; 7, Ab10-5; 8, Ab10-6; 9, estirpe de referência *A. baumannii* ATCC19606; 10, controle negativo. MM - Marcador de peso molecular NZYDNA Ladder VII.

A similaridade genética entre estes isolados foi posteriormente analisada através da construção de um dendrograma com base nos perfis electroforéticos obtidos por ERIC-PCR (Figura 9).

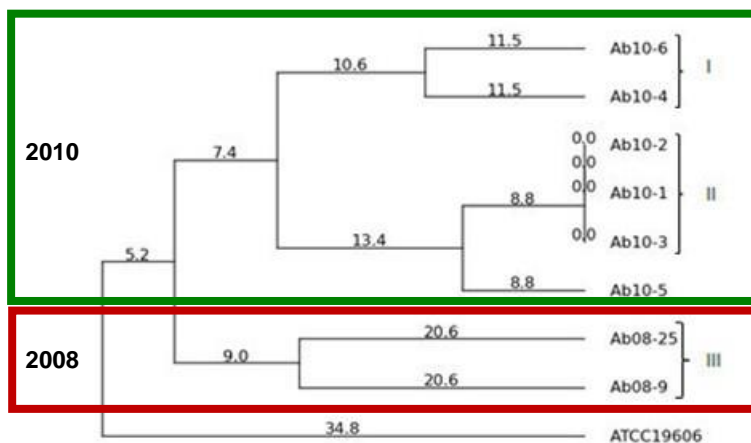


Figura 9. Similaridade genética entre os isolados de *A. baumannii* obtidos por ERIC-PCR. Dendrograma foi produzido com o auxílio do programa PyElph 1.4, utilizando o coeficiente de DICE e o método UPGMA (Pavel e Vasile, 2012). As distâncias genéticas encontram-se apresentadas em cada uma das ramificações.

Os resultados obtidos revelam uma elevada proximidade genética entre os isolados resistentes à colistina, com exceção da estirpe de referência que se apresenta filogeneticamente distanciada dos isolados clínicos. Identificaram-se três “clusters” - “cluster” I, 2 isolados, “cluster” II, 3 isolados e “cluster” III, 2 isolados - e 6 clones. Os isolados Ab10-1, Ab10-2 e Ab10-3 apresentam 100% de similaridade entre si, o que poderá indicar tratar-se, muito provavelmente, da mesma estirpe. De modo a podermos atestar se poderíamos ou não estar perante a mesma estirpe correlacionámos as similaridades genéticas destes isolados com os resultados do teste de susceptibilidade de Kirby-Bauer. Os resultados mostram que os três isolados apresentam o mesmo perfil de susceptibilidade, embora o isolado Ab10-3 seja susceptível à FEP e os restantes apresentem susceptibilidade intermédia (Tabela 10, pág. 30). Estes dados parecem indicar que, embora se trate da mesma estirpe, a resistência à FEP está a emergir nos isolados 1 e 2 quando comparado com o isolado 3. Relativamente à CMI da colistina, o isolado Ab10-3 varia apenas em 1 diluição das restantes não sendo por isso considerada uma diferença significativa (Tabela 11, pág. 32). Desde modo consideraram-se estes três isolados como sendo a mesma estirpe.

A tipagem por MLST revelou que todas as estirpes, com exceção da estirpe Ab10-6, pertencem ao ST350, complexo clonal (CC)118 e linhagem clonal II (GC2, do inglês “global clone” 2) também designado por clone internacional II. O clone ST350 é raro tendo sido reportado, até a data, apenas poucos isolados na China, Alemanha, Holanda, E.U.A (<https://pubmlst.org/abaumannii/>) e mais recentemente na Bulgária (Pfeifer *et al.*, 2016). A sua distribuição geográfica restrita e de baixa prevalência poderá ter a ver com a capacidade deste clone em se adaptar a diferentes contextos, quer relacionados com o hospedeiro quer ambientais. A estirpe Ab10-6 pertence ao ST218, CC92 e GC II. *A. baumannii* ST218 tinha sido já reportado em Portugal (Grosso *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2014), sendo um clone que se encontra associado aos fenótipos MDR e XDR e apresenta disseminação global (Marchaim *et al.*, 2017). Este clone foi recentemente encontrado no nosso laboratório num isolado clínico de *A. baumannii* MDR com heterorresistência à colistina, proveniente do mesmo hospital (Machado *et al.*, 2018). Um estudo publicado em 2010 que incluiu 540 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenemos, mas susceptíveis à colistina, isolados em Portugal no período compreendido entre 1998 e 2009 mostrou a existência de dois clones predominantes, ST98 e ST120 (Da Silva *et al.*, 2010). Manageiro e colegas (2011) analisaram uma coleção de 127 isolados clínicos de *A. baumannii* MDR com resistência aos

carbapenemos provenientes de nove hospitais, isolados entre 2005-2008 e 2009-2010, demonstrando a existência de cinco STs - ST118, o mais frequente; ST92 (actualmente classificado como ST208); ST98, ST187 e ST188, tendo esta sido a primeira descrição dos clones ST208 e ST118 em Portugal. De salientar que dos 127 isolados estudados, 1 apresentava resistência à colistina (Manageiro *et al.*, 2011). Um outro estudo publicado em 2011, avaliou a clonalidade de 213 isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem entre 2004-2008 provenientes da região norte e centro de Portugal (não incluídos nos estudos anteriores), indicando a predominância do clone ST208, seguido dos clones ST98, ST103 e ST218 (Grosso *et al.*, 2011). De notar que, contrariamente aos estudos anteriores (Da Silva *et al.*, 2010; Manageiro *et al.*, 2011), vários dos isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem apresentavam já resistência à colistina (Sousa *et al.*, 2014). No presente trabalho, e que tenhamos conhecimento, descrevemos pela primeira vez a existência do clone ST350 em Portugal associado à TDR sugerindo a sua importação, uma vez que não pertence aos clones já descritos e em circulação no nosso país. Verificamos também que os isolados de 2008 estão filogeneticamente distanciados dos isolados de 2010. No entanto, o facto de as duas estirpes de 2008 (Ab08-9 e Ab08-25) pertencerem ao mesmo clone que as seis das estirpes isoladas em 2010 (Ab10-1, Ab10-2, Ab10-3, Ab10-4, Ab10-5 e Ab10-6) parece suportar a existência de disseminação clonal e uma maior habilidade deste clone em se adaptar à nossa população que, associado ao seu background genético, parece favorecer a emergência de resistência aos antibióticos. Estes resultados requerem estudos mais aprofundados, p.e., epidemiologia molecular, resistência aos antibióticos e virulência, de modo a determinar se estes representam casos esporádicos importados sem transmissão posterior juntamente com vigilância permanente de *A. baumannii* MDR, XDR e TDR e sua epidemiologia em Portugal.

3.4. Pesquisa de mutações nos genes de resistência à colistina nos isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes

Prosseguimos com pesquisa de mutações nos genes associados a resistência à colistina em *A. baumannii* por PCR e sequenciação dos fragmentos amplificados, que revelou a presença de mutações em todas estirpes clínicas testadas (Tabela 15). Com excepção da mutação A401V no gene *pmrB*, nenhuma das restantes mutações encontradas neste trabalho se encontram descritas em *A. baumannii*. A mutação A401V no gene *pmrB* foi descrita em estirpes clínicas de *A. baumannii* isoladas na Coreia do Sul

(Park *et al.*, 2011). Não nos é possível associar uma determinada mutação a um genótipo em particular. Com exceção das mutações no gene *pmrA* que apenas estão presentes nas estirpes Ab08-9 e Ab08-25, todas as outras estirpes apresentam mutações em quatro dos cinco genes testados. Todas as estirpes possuem mutações duplas no gene *lpxC* e *pmrB* e as estirpes Ab10-2 e Ab10-3 possuem mutações duplas no gene *lpxD*. As estirpes Ab10-1, Ab10-2, Ab10-3 possuem uma inserção de 15 nucleótidos no gene *pmrB*, tal como a estirpe Ab10-5 que, como referido anteriormente, difere em apenas uma banda no seu perfil ERIC das estirpes Ab10-1, Ab10-2, Ab10-3, encontrando-se filogeneticamente relacionadas. Estas quatro estirpes diferem entre si nas mutações no gene *lpxD*: Ab10-1 e Ab10-5 apresentam apenas uma mutação enquanto que Ab10-2 e Ab10-3 possuem mutações duplas. A caracterização genotípica demonstrou que a resistência de alto nível à colistina nestas estirpes se deve à presença de mutações nos genes *lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, *pmrA* e/ou *pmrB*, sendo que das 10 mutações detectadas apenas 1 se encontra descrita e associada à resistência à colistina (A401V). Devido ao elevado número de mutações detectadas nestas estirpes e sendo estas, na sua maioria, comuns entre as oito estirpes é possível que nem todas estas mutações, com exceção da A401V, estejam associadas a resistência à colistina. Deste modo, trabalho futuro a realizar inclui o estudo da contribuição de cada um dos polimorfismos identificados na resistência a colistina, p.e., por mutagénesis dirigida. Estes resultados indicam a existência de alguma plasticidade genética nestas estirpes, proporcionando-lhes uma maior capacidade de adaptação e sobrevivência.

Tabela 15. Caracterização fenotípica das estirpes de *A. baumannii* em relação à presença de mutações nos genes associados a resistência à colistina.

Estirpe	CMI colistina (µg/ml)	Genes					ST	GC	
		<i>lpxA</i>	<i>lpxC</i>	<i>lpxD</i>	<i>pmrA</i>	<i>pmrB</i>			
ATCC19606	0.25	wt	wt	wt	wt	wt	52*	III**	
2008	Ab08-9	>256	Y97H	C96R N263D	E74K	I158T	F94L A401V	350	II
	Ab08-25	>256	Y97H	C96R N263D	E74K	I158T	F94L A401V	350	II
2010	Ab10-1	64	Y97H	C96R N263D	E74K	wt	Inserção de 15 nucleótidos entre os aminoácidos 679 e 695 A401V	350	II
	Ab10-2	64	Y97H	C96R N263D	F34L E74K	wt	Inserção de 15 nucleótidos entre os aminoácidos 679 e 695 A401V	350	II
	Ab10-3	128	Y97H	C96R N263D	F34L E74K	wt	Inserção de 15 nucleótidos entre os aminoácidos 679 e 695 A401V	350	II
	Ab10-4	>256	Y97H	C96R N263D	E74K	wt	F94L A401V	350	II
	Ab10-5	128	Y97H	C96R N263D	E74K	wt	Inserção de 15 nucleótidos entre os aminoácidos 679 e 695 A401V	350	II
	Ab10-6	128	Y97H	C96R N263D	E74K	wt	L228R A401V	218	II

* Janssen *et al.*, 1997, Giannouli *et al.*, 2013; ** Lucas *et al.*, 2018. CMI, concentração mínima inibitória; ST, “sequence type”; GC, “global clone”; wt, “wild-type”; A, alanina; C, cisteína; D, aspartato ou ácido aspártico; E, glutamato ou ácido glutâmico; F, fenilalanina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; N, asparagina; R, arginina; T, treonina; V, valina; Y, tirosina.

4. Conclusões gerais e perspectivas futuras

Os resultados obtidos nesta Dissertação demonstram que a actividade de efluxo contribui para a resistência à colistina, apesar da presença de mutações nos genes associados à resistência a este antibiótico em isolados clínicos de *A. baumannii* contrariando o dogma de que a actividade de efluxo apenas confere resistência em estirpes sem mutações associadas a resistência a um determinado composto antimicrobiano (Li *et al.*, 1994). Este dogma tem vindo a ser contestado em vários estudos envolvendo diversos microrganismos como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Chen *et al.*, 2007), *S. aureus* (Costa *et al.*, 2011), *M. tuberculosis* (Machado *et al.*, 2017), *M. avium* (Machado *et al.*, 2015) e neste trabalho, em *A. baumannii*.

Caracterizamos fenotipicamente uma colecção de 68 isolados de *A. baumannii* isolados entre Dezembro de 2008 e Janeiro de 2009 provenientes de um surto num hospital da região de Lisboa. Incluímos seis isolados resistentes à colistina isolados em Janeiro de 2010 com o intuito de averiguar se estes últimos poderiam estar relacionados com os isolados do ano anterior. Dos 74 isolados, 72 isolados MDR possuem resistência adicional aos carbapenemos (XDR). Destes, oito isolados possuem resistência à colistina (TDR), dois isolados em 2008 e seis em 2010. Focamos os próximos passos deste trabalho no estudo dos mecanismos de resistência (mutações e efluxo) e epidemiologia dos isolados resistentes à colistina. Realizamos a genotipagem dos isolados resistentes à colistina que nos permitiu identificar, pela primeira vez em Portugal, o clone ST350 presente em sete dos oito isolados resistentes à colistina. Um dos isolados pertence ao ST218. O ST218 apresenta uma distribuição mundial e está associado à MDR, enquanto que o ST350 não se encontra disseminado mundialmente, mas apenas restrito a alguns países. A detecção do ST350 em sete isolados num período de um ano - dois em Dezembro de 2008 e cinco em Janeiro de 2010 - parece indicar a emergência da disseminação do clone ST350 em Portugal, possivelmente em resultado de uma maior capacidade deste clone em se adaptar à nossa população, que associado ao seu background genético parece favorecer a emergência de resistência aos antibióticos, neste caso resistência à colistina.

A caracterização genotípica demonstrou que a resistência de alto nível à colistina nestas estirpes se deve à presença de mutações nos genes *lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, *pmrA* e/ou

pmrB, sendo que das 10 mutações detectadas apenas 1 se encontra descrita como estando associada à resistência à colistina.

Os resultados obtidos nos ensaios de sinergismo entre a colistina e o inibidor de efluxo tioridazina, possibilitaram-nos demonstrar a existência de sistemas de efluxo activos nestas estirpes. O facto de ter sido detectada a presença de sistemas de efluxo activos em estirpes que possuem mutações em genes associados a resistência à colistina, evidência a existência de actividade sinérgica, inferida através da redução das CMI's da colistina na presença de concentrações subinibitórias de tioridazina, entre a actividade de efluxo da colistina e a presença de mutações que conferem resistência nestas estirpes. Estes resultados podem indicar que uma actividade de efluxo aumentada em estirpes clínicas sujeitas a pressão antimicrobiana proporciona o desenvolvimento de mutações associadas a resistência durante uma terapêutica subinibitória, podendo estas vir a ser seleccionadas e estabelecer-se na população (Machado *et al.*, 2012). Conhecendo o historial clínico destes doentes poderia ter-nos ajudado a complementar/suportar esta hipótese, no entanto, não nos foi possível recolher esta informação em tempo útil para a inclusão neste manuscrito.

Dada a importância da colistina na terapêutica de infecções por *A. baumannii* XDR, torna-se necessário o estudo mais aprofundado dos mecanismos de resistência à colistina, bem como da disseminação deste microorganismo para a implementação de terapêuticas mais eficazes e medidas de prevenção e controlo mais apropriadas. Para tal, será necessário complementar este estudo com inclusão de isolados clínicos recentes que nos permitam fazer uma análise comparativa e evolutiva em termos epidemiológicos pois neste trabalho não temos uma amostragem significativa (8/74) para a realização de uma análise epidemiológica quer do estudo dos genótipos circulantes quer da prevalência de determinantes de resistência à colistina. Para isso, será importante (i) analisar a epidemiologia do clone ST350 em Portugal; (ii) estudar a contribuição de cada uma das mutações identificadas nos genes associados à resistência à colistina, p.e., por mutagénese dirigida; (iii) detectar a existência de actividade de efluxo por fluorimetria em tempo real usando brometo de etídio como substrato universal de bombas de efluxo; e (v) analisar a expressão de genes que codificam bombas de efluxo na presença e na ausência de colistina e brometo de etídio.

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o efluxo contribui para a resistência à colistina em estirpes que possuem mutações nos genes associados à resistência a este antibiótico e que o uso de compostos inibidores de efluxo pode ser considerado para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* MDR e XDR. O uso de compostos com capacidade para inibir bombas de efluxo em *A. baumannii*, como p.e. a tioridazina, pode aumentar a eficácia e estender a utilidade clínica dos antibióticos actualmente utilizados na terapêutica destas infecções.

5. Referências bibliográficas

- Adamus-Bialek, W., Wojtasik, A., Majchrzak, M., Sosnowski, M., Parniewski, P. 2009. (CGG) 4-based PCR as a novel tool for discrimination of uropathogenic *Escherichia coli* strains: comparison with enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J Clin Microbiol*, 47, 3937-3944.
- Adams, M.D., Nickel, G.C., Bajaksouzian, S., Lavender, H., Murthy, A.R., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A. 2009. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 3628-3634.
- Allen, K.D., Green, H.T. 1987. Hospital outbreak of multi-resistant *Acinetobacter anitratus*: an airborne mode of spread? *J Hosp Infect*, 9, 110-119.
- Antunes, J. 2018. Estudo da contribuição de bombas de efluxo, porinas e β -lactamases na resistência aos carbapenemos em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*. Tese de Mestrado em Microbiologia Médica. Unidade de Microbiologia Médica. Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- Antunes, L.C.S., Visca, P., Towner, K.J. 2014. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen. *Pathog Dis*, 71, 292-301.
- Arroyo, L.A., Herrera, C.M., Fernandez, L., Hankins, J.V, Trent, M.S., Hancock, R.E. 2011. The PmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetocacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3743-3751.
- Baron, S., Hadjadj, L., Rolain, J.M., Olaitan, A.O. 2016. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents*, 48, 583-591.
- Bartual, S., Seifert H., Hipper, C., Luzon, M., Wisplinghoff, M.A.D., Rodríguez-Varela, F. 2005. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*, 43, 4382-4390.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45, 493-496.
- Beceiro, A., Llobet, E., Aranda, J., Bengoechea, J.A., Doumith, M., Hornsey, M., Dhanji, H., Chart, H., Bou, G., Livermore, D.M., Woodford, N. 2011. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the PmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3370-3379.
- Bonnin, R.A., Nordmann, P., Poirel, L. 2013. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 11, 571-583.
- Buxton, A.E., Anderson, R.L., Werdegar, D., Atlas, E. 1978. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*. Epidemiologic characteristics. *Am J Med*, 65, 507-513.

- Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., Bai, N. 2012. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother*, 67, 1607-1615.
- Cai, X., Yang, Z., Dai, J., Chen, K., Zhang, L., Ni, W., Wei, C., Cui, J. 2017. Pharmacodynamics of tigecycline alone and in combination with colistin against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Int J Antimicrob Agents*, 49, 609-616.
- Carvalho, V.D., Cogo, L.L. 2014. Polymyxins resistance in gram-negative bacteria: a microbiological review. *Visão Acadêmica*, 15, 561-565.
- Casarez, E.A., Pillai, S.D., Di Giovanni, G.D. 2007. Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR. *Water Res*, 41, 3643-3684.
- Chen, Q., Li, X., Zhou, H., Jiang, Y., Chen, Y., Hua, X. Yu, Y. 2014. Decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii* mediated by a mutation in *trm* encoding SAM-dependent methyltransferase. *J Antimicrob Chemother*, 69, 72-76.
- Chen, S., Cui, S., McDermott, P.F., Zhao, S., White, D.G., Paulsen, I., Meng, J. 2007. Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 535-542.
- Cherkaoui, A., Emonet, S., Renzi, G., Schrenzel, J. 2015. Characteristics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Geneva during colonization or infection. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 14, 42.
- Chopra, I., Roberts, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65, 232-260.
- Cisneros, J.M., Rodriguez-Bapo, J. 2002. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect*, 116, 87-93.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018a. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. Informational Supplement. M100-S17. Wayne, Pa, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, pp 42-44.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. Informational Supplement. M100-S17. Wayne, Pa, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, pp 50-52.
- Coelho, J.M., Turton, J.F., Kaufmann, M.E., Glover, J., Woodford, N., Warner, M., Palepou, M-F., Pike, R., Pitt, T., Patel, B., Livermore, D. 2006. Occurrence of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol*, 44, 3623-3627.
- Corvec, S., Poirel, L., Naas, T., Drugeon, H., Nordmann, P. 2007. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*OXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 1530-1533.

- Costa, S.S., Falcão, C., Viveiros, M., Machado, D., Martins, M., Melo-Cristino, J., Amaral, L., Couto, I. 2011. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*, 11, 241.
- Costa, S.S., Viveiros, M., Amaral, L., Couto, I. 2013. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. *Open Microbiol J*, 7, 59-71.
- Coyne, S., Rosenfeld, N., Lambert, T., Courvalin, P., Perichon, B. 2010. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 4389-4393.
- Da Silva, G.J., Mendonça, N., Batista, G., Duarte, A. 2010. Sequence types of Portuguese carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected over 10 years. *J Antimicrob Chemother*, 65, 2254-2256.
- Damier-Piolle, L., Magnet, S., Brémont, S., Lambert, T., Courvalin, P. 2008. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 557-562.
- De Sousa, J.C.F., Peixe, L.V. 2010. *Antibióticos antibacterianos*. In: Ferreira, W. F. C., Sousa, J, C. F., Lima, N. (ed.). *Microbiologia Volume 1*. Lisboa, Portugal: Lidel – Edições Técnicas, pp. 453-469.
- DeMarco, C.E., Cushing, L.A., Frempong-Manso, E., Seo, S.M., Jaravaza, T.A., Kaatz, G.W. 2007. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 3235-3239.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 26, 297-307.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*, 5, 939-951.
- Direcção Geral da Saúde. 2017. Programa de prevenção e controlo de infecções e de resistência aos antimicrobianos. Lisboa, Portugal. pp. 1-24.
- Dixon, R.A., Chopra, I. 1986. Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob Agents Chemother*, 29, 781-788.
- Doan, T., Fung, H.B., Mehta, D., Riska, P.F. 2006. Tigecycline: a glycylicline antimicrobial agent. *Clin Ther*, 28, 1079-1106.
- European Bioinformatics Institute. 2019. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (acedido a 24 Abril, 2019).
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2015. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014, annual report of the European antimicrobial resistance surveillance network (EARS-Net). Stockholm, Sweden: The European Centre for Disease Prevention and Control, pp. 8-21.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2017. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0. <http://www.eucast.org>.

- Euzéby, J.P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 590-592.
- Evans, B.A., Hamouda, A., Amyes, S.G. 2013. The rise of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Curr Pharm Des*, 19, 223-38.
- Falagas, M.E., Kasiakou, S.K. 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*, 40, 1333-1341.
- Falagas, M.E., Karveli, E.A. 2007. The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications. *Clin Microbiol Infect*, 13, 117-119.
- Falagas, M.E., Lourida, P., Poulidakos, P., Rafailidis, P.I., Tansarli, G.S. 2014. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 654-663.
- Fishbain, J., Peleg, A.Y. 2010. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis*, 51, 79-84.
- Gales, A.C., Jones, R.N., Sader, H.S. 2011. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *J Antimicrob Chemother*, 66, 2070-2074.
- Giannouli, M., Antunes, L.C., Marchetti, V., Triassi, M., Visca, P., Zarrilli, R. 2013. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect Dis*, 13:282.
- Groblacher, B., Kunert, O., Bucar, F. 2012. Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorg Med Chem*, 20, 2701-2706.
- Grosso, F., Quinteira, S., Peixe, L. 2011. Understanding the dynamics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal. *Clin Microbiol Infect*. 17, 1275-1279.
- Hartzell, J.D., Kim, A.S., Kortepeter, M.G., Moran, K.A. 2007. *Acinetobacter pneumonia*: a review. *Med Gen Med*, 9, 4.
- Héritier, C., Poirel, L., Fournier, P.E., Claverie, J.M., Raoult, D., Nordmann, P. 2005. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 4174-4179.
- Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M., Seifert, H. 2010. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 65, 233-238.
- Janssen, P., Maquelin, K., Coopman, R., Tjernberg, I., Bouvet, P., Kersters, K., Dijkshoorn, L. 1997. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 1179-1187.
- Jolley, K.A., Bray, J.E., Maiden, M.C.J. 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*, 3, 24.
- Jones, R.N., Ferraro, M.J., Reller, L.B., Schreckenberger, P.C., Swenson, J.M., Sander, H.S. 2007. Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*, 45, 227-230.

- Karageorgopoulos, D.E., Falagas, M.E. 2008. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis*, 8, 751-762.
- Karageorgopoulos, D.E., Kelesidis, T., Kelesidis, I., Falagas, M.E. 2008. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. *J Antimicrob Chemother*, 62, 45-55.
- Kumar, A., Schweizer, H.P. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 1486-1513.
- Landersdorfer, C.B., Nation, R.L. 2015. Colistin: how should it be dosed for the critically ill? *Semin Respir Crit Care Med*, 36, 126-135.
- Li, J., Nation, R.L., Turnidge, J.D., Milne, R.W., Coulthard, K., Rayner, C.R., Paterson, D.L. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*, 6, 589-601.
- Li, X.Z., Livermore, D.M., Nikaido, H. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 38, 1732-1741.
- Li, X.Z., Plésiat, P., Nikaido, H. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microb Rev*, 28, 337-418.
- Liang, W., Liu, X., Huang, j., Zhu, D., Li, J., Zhang, J. 2011. Activities of colistin- and minocycline-based combinations against extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from intensive care unit patients. *BMC Infectious Diseases*, 11:109.
- Lucas, D.D., Crane, B., Wright, A., Han, M.L., Moffatt, J., Bulach, D., Gladman, S.L., Powell, D., Aranda, J., Seemann, T., Machado, D., Pacheco, T., Marques, T., Viveiros, M., Nation, R., Li, J., Harper, M., Boyce, J.D. 2018. Emergence of high-level colistin resistance in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate mediated by inactivation of the global regulator H-NS. *Antimicrob Agents Chemother*, 62, e02442-17.
- Machado, D., Antunes, J., Simões, A., Perdigão, J., Couto, I., McCusker, M., Martins, M., Portugal, I., Pacheco, T., Batista, J., Toscano, C., Viveiros, M. 2018. Contribution of efflux to colistin heteroresistance in a multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *J Med Microbiol*, 67, 740-749.
- Machado, D., Cannalire, R., Santos Costa, S., Manfroni, G., Tabarrini, O., Cecchetti, V., Couto, I., Viveiros, M., Sabatini, S. 2015. Boosting effect of 2-phenylquinoline efflux inhibitors in combination with macrolides against *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium avium*. *ACS Infec Dis*, 1, 593-603.
- Machado, D., Coelho, T.S., Perdigão, J., Pereira, C., Couto, I., Portugal, I., Maschmann, R., Ramos, D., von Groll, A., Rossetti, M., Silva, P.A., Viveiros, M. 2017. Interplay between mutations and efflux in drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol*, 8, 711.

- Machado, D., Couto, I., Perdigão, J., Rodrigues, L., Portugal, I., Baptista, P., Veigas, B., Amaral, L., Viveiros, M. 2012. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS one*, 7, e34538.
- Machado, D., Fernandes, L., Costa, S., Cannalire, R., Manfroni, G., Tabarrini, O., Couto I., Sabatini, S., Viveiros, M. 2017. Mode of action of the 2-phenylquinoline efflux inhibitor PQQ4R against *Escherichia coli*. *PeerJ*, 5, e3168.
- Mahillon, J., Chandler, M. 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Bio Rev*, 62, 725-774.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D., Feavers, I., Achtman, M., Spratt, B. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3140-3145.
- Manageiro, V., Jones-Dias, D., Ferreira, E., Louro, D., Caniça, M. 2011. Phenotypic and molecular characterisation of carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Portugal. *Clin Microb Infect*, 17, S381.
- Manchanda, V., Sanchaita, S., Singh, N.P. 2010. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *J Global Infect Dis*, 2, 291-304.
- Marchaim, D., Levit, D., Zigran, R., Gordon, M., Lazarovitch, T., Carrico, J.A., Chalifa-Caspi, V., Moran-Gilad, J. 2017. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in an endemic setting. *Future Microbiol*, 12, 271–283.
- McConnell, M.J., Actis, L., Pachón, J. 2013. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev*, 37, 130-155.
- McCoy, L.S., Xie, Y., Tor, Y. 2011. Antibiotics that target protein synthesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2, 209-232.
- Mendes, R.E., Fritsche, T.R., Sader, H.S., Jones, R.N. 2008. Increased antimicrobial susceptibility profiles among polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Clin Infect Dis*, 46, 1324-1326.
- Moffatt, J.H., Harper, M., Adler, B., Nation, R.L., Li, J., Boyce, J.D. 2011. Insertion sequence ISAbal1 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3022-3024.
- Moffatt, J.H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J.D.F., Vinogradov, E., Seeman, T., Henry, R., Crane, B., St. Michael, F., Cox, A.D., Adler, B., Nation, R.L., Li, J., Boyce, J.D. 2010. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 4971-4977.
- Montefour, K., Frieden, J., Hurst, S., Helmich, C., Headley, D., Martin, M. 2008. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. *Crit Care Nurse*, 28, 15-25.
- Mugnier, P.D., Poirel, L., Nordmann, P. 2009. Functional Analysis of Insertion Sequence ISAbal1, Responsible for Genomic Plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*, 191, 2414–2418.

- Mussi, M.A., Limansky, A.S., Viale, A.M. 2005. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of β -barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 1432-1440.
- Nation, R.L., Li, J. 2009. Colistin in the 21st Century. *Curr Opin Infect Dis*, 22, 535-543.
- Organização Mundial de Saúde. 2017a. Antibacterial agents in clinical development an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. Geneva. World Health Organization, 2017. WHO/EMP/IAU/2017.12.
- Park, A.J., Krieger, J.R., Khursigara, C.M. 2016. Survival proteomes: the emerging proteotype of antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol*, 40, 323-342.
- Park, Y.K., Choi, J.Y., Shin, D., Ko, K.S. 2011. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*, 27, 525-530.
- Parte, A.C. 2013. LPSN – list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 42, D613–D616.
- Parte, A.C. 2018. LPSN – List of Prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int J Syst Evol Microbiol*, 68, 1825-1829.
- Paulsen, I.T., Brown, M.H., Skurray, R.A. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microb Rev*, 60, 575-608.
- Pavel, A.B., Vasile, C.L. 2012. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*, 13, 9.
- Peleg, A.Y., Seifert, H. Paterson, D.L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21, 538-582.
- Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., Rather, P.N., Bonomo, R.A. 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 3471-3484.
- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., Crandall, Keith A. 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*, 16, 38-53.
- Petrosillo, N., Ioannidou, E., Falagas, M.E. 2008. Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies. *Clin Microbiol Infect*, 14, 816-827.
- Pfeifer, Y., Trifonova, A., Pietsch, M., Brunner, M., Todorova, I., Gergova, I., Wilharm, G., Werner, G., Savov, E. 2016. Clonal transmission of gram-negative bacteria with carbapenemases NDM-1, VIM-1, and OXA-23/72 in a Bulgarian hospital. *Microb Drug Resist*, 23, 301-307.
- Poirel, L., Bonnin, R.A., Nordmann, P. 2012. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol*, 12, 883-893.
- Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P. 2017. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev*, 30, 557-596.

- Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 24-38.
- Poirel, L. Nordmann, P. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 12, 826-836.
- Reischl, U., Linde, H.J., Metz, M., Leppmeier, B., Lehn, N. 2000. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol*, 38, 2429-2433.
- Ruzin, A., Keeney, D., Bradford, P. 2007. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Antimicrob Chemother*, 59, 1001-1004.
- Seward, R.J., Lambert, T., Towner, K.J. 1998. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol*, 47, 455-462.
- Shahid, M., Sobia, F., Singh, A., Malik, A., Khan, H.M., Jonas, D., Hawkey, P.M. 2009. Beta-lactams and beta-lactamase-inhibitors in current- or potential-clinical practice: a comprehensive update. *Crit Rev Microbiol*, 35, 81-108.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Syst Biol*, 7, 539.
- Silva, G.J. 2014. *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e bactérias relacionadas. In: Microbiologia Médica, Volume 1. Barroso, H., Melo-Silvestre, A., Taveira, N.; LIDEL - Edições Técnicas, Lisboa; pp. 382-390.
- Singhai, M., Malik, A., Shahid, M., Malik, M.A., Goyal, R. 2012. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. *J Glob Infect Dis*, 4, 193-198.
- Sousa, C., Silva, L., Grosso, F., Lopes, J., Peixe, L. 2014. Development of a FTIR-ATR based model for typing clinically relevant *Acinetobacter baumannii* clones belonging to ST98, ST103, ST208 and ST218. *J Photochem Photobiol B*. 133, 108-114.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., Plaza, O.B. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 19, 6823-6831.
- Viehman, J.A., Nguyen, M.H., Doi, Y. 2014. Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs*, 74, 1315-1333.
- Vila, J., Pachón, J. 2008. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opin Pharmacother*, 9, 587-599.
- Visca, P., Seifert, H., Towner, K.J. 2011. *Acinetobacter* infection - An emerging threat to human health. *IUBMB Life*, 63, 1048-1054.
- Weber, B.S., Harding, C.M., Feldman, M.F. 2016. Pathogenic *Acinetobacter*: from the cell surface to infinity and beyond. *J Bacteriol*, 198, 880-887.

- Wilkens, S. 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000 Prime Rep*, 7, 1-9.
- Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., Spellberg, B. 2017. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin Microbiol Rev*, 30, 409-447.
- Yahav, D., Farbman, L., Leibovici, L., Paul, M. 2012. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect*, 18, 18-29.
- Yau, W., Owen, R.J., Poudyal, A., Bell, J.M., Turnidge, J.D., Yu, H.H., Nation, R.L., Li, J. 2009. Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Infect*, 58, 138-144.
- Yu, Z., Qin, W., Lin, J., Fang, S., Qiu, J. 2015. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res Int*, 1-11.
- Zarrilli, R., Giannouli, M., Tomasone, F., Triassi, M., Tsakris, A. 2009. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries*, 3, 335-341.
- Zavascki, A.P., Carvalhaes, C.G., Picão, R.C., Gales, A.C. 2010. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8, 71-93.
- Zhanel, G.G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D. J., Noreddin, A.M., Karlowsky, J.A. 2007. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, 67, 1027-1052.